

イネにおけるサイトゾル型グルタミン合成酵素1;2 に依存した分げつ生長制御に関する研究

著者	大橋 美和
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17776号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121762

イネにおける
サイトゾル型グルタミン合成酵素 1;2 に依存した
分げつ生長制御に関する研究

大橋 美和

目次

第一章	序論	(5 - 8)
第二章	GS1;2 欠損が分げつの生長や地上部基部の代謝に及ぼす影響の解析	
	第一節 緒言	(9 - 10)
	第二節 材料と方法	(11 - 21)
	第三節 結果	(22 - 53)
	第四節 考察	(54 - 56)
第三章	GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での植物ホルモンとの関連性の解析	
	第一節 緒言	(57 - 59)
	第二節 材料と方法	(60 - 66)
	第三節 結果	(67 - 83)
	第四節 考察	(84 - 87)
第四章	GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での窒素代謝との関連性の解析	
	第一節 緒言	(88 - 90)
	第二節 材料と方法	(91 - 95)
	第三節 結果	(96 - 117)
	第四節 考察	(118 - 120)
第五章	GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での糖代謝との関連性の解析	
	第一節 緒言	(121 - 122)
	第二節 材料と方法	(123 - 125)
	第三節 結果	(126 - 134)
	第四節 考察	(135 - 136)
第六章	総合考察	(137 - 143)
	引用文献	(144 - 163)
	謝辞	(164)

Abbreviations

2-OG	2-oxoglutarate
ABA	abscisic acid
AM	axillary bud meristem
AMP	adenosine monophosphate
AMT	ammonium transporter
AP	alkaline phosphatase
Arg	arginine
AS, ASN	asparagine synthetase
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
ATP	adenosine triphosphate
BAP	6-benzylaminopurine
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate
bHLH	basic helix-loop-helix
BSA	bovine serum albumin
CBL	calcineurin B-like protein
cDNA	complementary DNA
CDS	coding sequence
cFBP	cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase
CHL	chlorate-resistant
CIPK	CBL-interacting protein kinase
COMT	caffeate O-methyltransferase
CPK	Ca ²⁺ dependent protein kinase
cv.	cultivar
CYP735A	cytochrome P450 monooxygenase 735A
Cys	cysteine
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZR	cZ riboside
cZRP	cZR 5'-phosphate
dH ₂ O	distilled water
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
DOF	DNA-binding with one zinc finger transcription factor
DW	dry weight
DZ	dihydrozeatin

DZR	DZ riboside
DZRP	DZR 5'-phosphate
<i>epi</i> -5DS	<i>epi</i> -5 deoxystriol
F1	first filial
Fd	ferredoxin
FDR	false discovery rate
FW	fresh weight
GC-TOF MS	gas chromatograph-time of flight mass spectrometry
Gln	glutamine
Glu	glutamate
Gly	glycine
GOGAT	glutamate synthase
GS, GLN	glutamine synthetase
HPLC	high performance liquid chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
IgG	immunoglobulin G
Ile	isoleucine
iP	N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenine
iPR	iP riboside
iPRP	iPR 5'-phosphate
IPT	adenosine-phosphate isopentenyltransferase
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
Leu	leucine
LOG	phosphoribohydrolase LONELY GUY
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
MSX	methionine sulfoximine
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NBT	nitroblue tetrazolium
NIN	nodule inception
NLP	NIN-like protein
NRT	nitrate transporter
Os	<i>Oryza sativa</i>
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAL	phenylalanine ammonia-lyase
PBS	phosphate-buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
<i>pg</i>	picogram
PVDF	polyvinylamide difluoride
qPCR	quantitative PCR
RAP-DB	The Rice Annotation Project Database
RNA	ribonucleic acid
RR	response regulator
RT-PCR	reverse transcription PCR
SAM	shoot apical meristem
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEF	soybean embryo factor
Ser	serine
SPAD	Soil and Plant Analyzer Development chlorophyll meter
SPP	sucrose phosphate synthase
SPS	sucrose-phosphatase
SuSy	sucrose synthase
TCA	tricarboxylic acid
Thr	threonine
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Tween-20	polyoxyethylen (20) sorbitan monolaurate
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
tZR	tZ riboside
tZRP	tZR 5'-phosphate
UDP	uridine diphosphate
v/v	volume per volume
Val	valine
w/v	weight per volume

第一章 序論

窒素は、植物にとって最も不足しがちな多量必須栄養素の一つであるため、窒素栄養の獲得と利用は、植物の生長と生産性に大きく影響する。植物は、光エネルギーを利用した光合成を行い、エネルギー・還元力や炭素骨格を生産する。これらを利用して、植物は、主に根から吸収した無機態窒素を有機化し、タンパク質、核酸、クロロフィル、アミノ酸、ATPをはじめ、植物が成育する上で必要な生体構成成分を生合成する。また、植物は移動できないため、根で無機態窒素を積極的に吸収・同化する機構とともに、導管・篩管などの維管束通導組織を介して、器官・組織間で窒素栄養や窒素同化代謝産物を長距離輸送して窒素を有効に利用する仕組みを備えている(Yamaya and Oaks, 2004)。

共生窒素固定を行うマメ科植物などを除き、多くの高等植物が利用する土壌中の窒素の主な分子形態は、無機態窒素のアンモニウムイオン(NH_4^+) または、硝酸イオン(NO_3^-) である。 NH_4^+ は、 NO_3^- と比較して、植物体内でその同化に必要とされるエネルギー量は少ないが、 NH_4^+ を主要な窒素源として利用する植物種はわずかしかな存在しない(Britto and Kronzucker, 2002)。特にイネ(*Oryza sativa*)のように冠水下の水田のような還元的土壌条件下で成育する植物は、無機態窒素源として、主に NH_4^+ を利用する (Yoshida, 1981; Yamaya and Oaks, 2004)。このため、イネでは、根における NH_4^+ の吸収・同化と同化窒素の地上部輸送利用の効率や地上部における老化器官から発達中の若い器官への窒素の転流と再利用の効率が生長や生産性を決定すると考えられている (Sonoda et al., 2003a; Yamaya and Kusano, 2014)。

植物では、根において土壌の NH_4^+ を吸収するだけでなく (Sonoda et al., 2003a)、生育の各段階においても体内で NH_4^+ が発生する。例えば、光合成と協調した光呼吸系において、ミトコンドリアでのグリシンからセリンへの脱炭酸反応で多量の NH_4^+ が発生する (Kendall et al., 1986; Wallsgrove et al., 1987)。また、植物は、下位葉身などの老化器官のタンパク質やクロロフィルを含む含窒素生体高分子を分解し、成長中の若い器官へと篩管を介して窒素を転流して再利用する。この老化葉での含窒素生体高分子分解の結果、 NH_4^+ が生成される (Yamaya and Kusano, 2014)。さらに、イネでは、未成熟葉の維管束組織にリグニンが蓄積するが (Sakurai et al., 2001)、フランスカイガンショウ (*Pinus pinaster*) の木化におけるメチル化反応 (Villalobos et al., 2012) と同様に、イネでも、リグニン合成経路のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) の酵素反応で NH_4^+ が発生する (Craven-Bartle et al., 2013)。このように生育の各段階において体内で NH_4^+ が発生するが、植物体内への過剰な NH_4^+ の蓄積は有害であり、生育傷害をきたすことがある (Kronzucker et al., 2002; Britto and Kronzucker, 2002)。実際に、欧米の窒素肥料を過剰施肥した耕作地や放牧地では、高レベルの NH_3 ガス放出と降雨を介した土壌 NH_4^+ 沈着に起因する森林や作物の深刻な NH_4^+ 障害が引き起こされている (Pearson and Stewart, 1993; Padgett et al., 1999; Britto and Kronzucker, 2002)。従って、植物は、土壌から吸収した NH_4^+ や体内で発生・

蓄積した NH_4^+ をアミノ酸などの無害な有機態へ迅速かつ効率的に同化して利用する機能を獲得していると考えられる。

植物では、 NH_4^+ は、主にグルタミン合成酵素 (glutamine synthetase: GS) とグルタミン酸合成酵素 (glutamate synthase, glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase: GOGAT) の共役酵素反応系 (GS/GOGAT サイクル) により初期同化される (Lea and Miflin, 1974; Yamaya and Oaks, 2004)。GS (EC 6.3.1.2) は、 Mg^{2+} 存在下で ATP 依存的に NH_4^+ をグルタミン酸 (Glu) へと取り込み、グルタミン (Gln) を合成する反応を触媒する酵素である (Fig. 1)。GS には、サイトゾル型 GS (GS1) とプラスチド・葉緑体型 GS (GS2) の 2 つの分子種が存在することが知られている (Fig. 1; Yamaya and Oaks, 2004)。GOGAT は、Gln と 2-オキソグルタル酸 (2-OG) から 2 分子の Glu を生成する反応を触媒する酵素である。この GOGAT 反応は、アミノ基を受容する炭素骨格として 2-OG を必要とすることから、窒素代謝と炭素代謝の接点に位置する重要な反応である (Hodges, 2002)。GOGAT には、還元型のフェレドキシン (Fd) を電子供与体とする Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) と NADH を電子供与体とする NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) の少なくとも 2 つの分子種が存在することが知られている (Yamaya and Oaks, 2004)。さらに、Gln のアミド基は、ATP 依存的なアスパラギン合成酵素 (asparagine synthetase: AS, ASN; EC 6.3.5.4) 反応により、アスパラギン酸 (Asp) に取り込まれアスパラギン (Asn) が合成される (Lea et al., 2007; Gaufichon et al., 2010)。

イネの核ゲノムには、1 分子種の GS2 遺伝子 (*OsGS2*) と 3 分子種の GS1 遺伝子 (*OsGS1;1*, *OsGS1;2*, *OsGS1;3*) が小遺伝子ファミリーとしてコードされ (Fig. 1)、また、GOGAT 遺伝子も 1 分子種の Fd-GOGAT 遺伝子 (*OsFd-GOGAT*) と 2 分子種の NADH-GOGAT 遺伝子 (*OsNADH-GOGAT1*, *OsNADH-GOGAT2*) が小遺伝子ファミリーとしてコードされている (Tabuchi et al., 2007)。GS2 と Fd-GOGAT は緑葉における主な GS/GOGAT 分子種であり、葉緑体のストローマに局在する (Lea and Miflin, 2003)。GS2 欠損オオムギ変異体や Fd-GOGAT 欠損オオムギ変異体は、光呼吸の生ずる条件下では正常に生育できないことから、緑葉の GS2 と Fd-GOGAT は、光呼吸経路から放出される NH_4^+ の再同化を主に担うことが立証された (Kendall et al., 1986; Wallsgrove et al., 1987)。一方、上記の変異体は、光呼吸を抑制した高 CO_2 濃度の気象条件下では正常に生育することから、GS1 と NADH-GOGAT が光呼吸以外の NH_4^+ 同化において、重要な役割を有することが推測されていた (Lea and Miflin, 2003)。ここで、時期・組織特異的な発現解析や近年の内在性レトロトランスポゾン *Tos17* 挿入遺伝子破壊突然変異体イネを用いた解析から、イネにおける GS1 と NADH-GOGAT の各分子種の個別機能が明らかにされてきている。GS1;1 は、主に葉身維管束組織篩部の柔細胞と伴細胞に局在し、NADH-GOGAT2 と共役して、老化葉身での転流グルタミン合成を担うことが示された (Sakurai et al., 1996; Tabuchi et al., 2005; Tamura et al., 2011)。特に、GS1;1 欠損が、著しい生育遅延と子実の登熟傷害・不稔を引き起こし、GS1;1 がイネの正常な生育と生存に必須であることが判明した (Tabuchi et al., 2005; 2007)。

また、GS1;1 が、未成熟葉の維管束組織でのリグニン合成過程の PAL 酵素反応で発生する NH_4^+ の同化に関わる可能性も示唆された (Sakurai et al., 2001)。NADH-GOGAT1 は、イネの地上部では、未成熟な葉身の維管束組織の篩部木部柔細胞・メストム鞘細胞および登熟初期の玄米の背部大維管束の篩部木部柔細胞・珠心突起細胞・珠心表皮細胞・糊粉層細胞に局在し、転流グルタミンのグルタミン酸への初期変換再利用を担うことが示された (Hayakawa et al., 1994; Tamura et al., 2010)。一方、 NH_4^+ 供与後のイネ幼植物の根の表皮・外皮から成る表層細胞群では、GS1;2 と NADH-GOGAT1 が短時間で顕著に蓄積し、GS1;2 と NADH-GOGAT1 がイネ根での NH_4^+ の初期同化に重要であることが明らかになっている (Fig. 1; Ishiyama et al. 1998; 2003; 2004; Tamura et al., 2010; Funayama et al., 2013)。ここで、GS1;2 欠損変異体イネにおいては、遺伝背景の野生型イネと比較して、穂に実る穎果の数や重さに差異はなかったが、分げつ数と穂数の減少によりコメの収量の減少が観察された (Funayama et al., 2013)。分げつ数の減少は穂数の減少に直結し、穂が実る有効分げつの数は、穀物の生産性に影響を与える重要な収量因子の一つである。従って、GS1;2 がコメの収量へ影響を与える酵素であることが示唆されたが、分げつの生長における GS1;2 の役割は不明なままであった。

イネは、日本を含めた東アジアの食糧供給上の基幹穀物であり、世界人口の約半数が主食とする。コメの生産性は、穂数、籾数、登熟歩合、玄米重によって規定される (Sakamoto and Matsuoka, 2008)。イネでは、穂は主茎(稈)と分げつ(枝分かれ)で実るため、分げつもコメの生産性を規定する重要な一要因である。栄養成長期に窒素栄養が不十分だと有効分げつ数は減少し、充分だと分げつ数は増加する (Mae, 1997; Sakakibara et al., 2006; Liu et al., 2011)。しかし、この窒素栄養が分げつの発達を制御する詳細な分子機構は解明されていない。分げつは、「分裂組織を含む腋芽の形成」と「腋芽の伸長」の 2 段階を経て、形成される (Hoshikawa, 1989)。腋芽の伸長の制御には複数の要因が複雑に影響しあっており、その制御に関わる要因は、外的要因と内的要因に大別される (Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012; Domagalska and Leyser, 2011)。外的要因とは、光の強度や光の波長、物理的障害や土壌の栄養状態であり、内的要因とは、代謝産物の利用効率と植物ホルモンのシグナル伝達ネットワークである。

本博士論文研究では、窒素の利用性に応じて調節される分げつ生長の分子機構を解明することを目指し、逆遺伝学的手法に加え、トランスオミクス手法や細胞レベルでの高解像度解析手法により、分げつ生長における GS1;2 の役割の解析を行った。まず、第二章では、GS1;2 欠損が、イネの分げつ生長や腋芽を含む地上部基部での代謝に及ぼす影響を解析した。次に、第三章では、GS1;2 欠損による分げつ数減少と植物ホルモンとの関連性を解析した。さらに、第四章と第五章では、第二章の結果をもとに、GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での窒素代謝あるいは糖代謝の変化の関連性を解析した。そして、得られた結果をもとに、GS1;2 により合成される Gln の利用性に依存した腋芽の伸長制御機構について考察した。

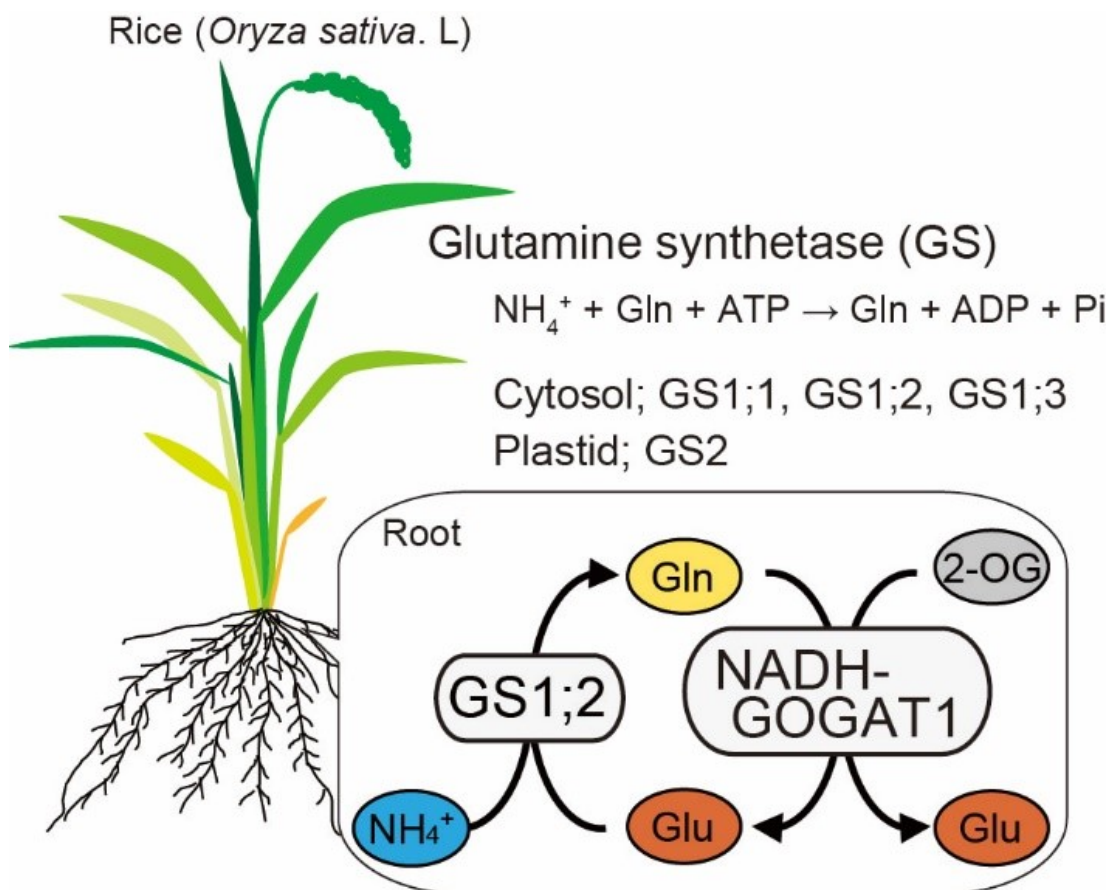


Figure 1. Schematic model of the glutamine synthetase / glutamate synthase cycle, that assimilates NH_4^+ into glutamine in rice roots. NH_4^+ is assimilated by coupled reactions of glutamine synthetase (GS), which catalyzes the ATP-dependent conversion of glutamate (Glu) to glutamine (Gln), and glutamate synthase (GOGAT), which generates two molecules of Glu from Gln and 2-oxoglutarate (2-OG) in the presence of either a reduced form of ferredoxin (Fd) or NADH (Lea and Miflin, 1974; Yamaya and Oaks, 2004). A small gene family has been identified that encodes three cytosolic isoenzymes of GS1 (GS1;1, GS1;2, and GS1;3) and plastidic/chloroplastic one of GS2 (Tabuchi et al., 2007). GS1;2 and NADH-GOGAT1 are important for the primary assimilation of NH_4^+ in the rice roots (Tamura et al., 2010; Funayama et al., 2013).

第二章 GS1;2 欠損が分げつの生長や地上部基部の代謝に及ぼす影響の解析

第一節 緒言

生体内における標的遺伝子産物の生理学的機能を解析するために、標的遺伝子を破壊した機能欠損変異体を用いることは有効である。イネでは、特に内在性レトロトランスポゾン *Tos17* 挿入による遺伝子破壊系統が、農業生物資源研究所遺伝子機能研究チームにより整備されてきた（ミュータントパネルデータベース；<http://pc7080.abr.affrc.go.jp/~miyao/pub/tos17/>）。イネの *Tos17* は、RNA 型のレトロトランスポゾンであり、「copy-and-paste」型の自己複製的転移機能を有するため、転移する度にそのコピー数が増加する(Hirochika et al., 1996; Hirochika, 1997; Miyao et al., 2003)。*Tos17* は、脱分化したカルスの状態で活性化され、カルス培養の間に転写・逆転写された後にゲノム上の任意の場所に転移・挿入される。*Tos17* の自己複製的転移能は、再分化後の植物体では速やかに不活性化し、カルス培養時に転移した *Tos17* はゲノム上で安定的に維持されて後代に遺伝する。特定遺伝子上に *Tos17* が挿入された再分化後代においては、特定遺伝子に関して *Tos17* が挿入された対立遺伝子がホモ接合体となった個体 (-/-)、*Tos17* が挿入された対立遺伝子と *Tos17* が挿入されていない対立遺伝子がヘテロ接合体となった個体 (+/-)、*Tos17* が挿入されていない対立遺伝子がホモ接合体となった個体 (+/+) に分離する。これらのうち、特に特定遺伝子のエキソン上に *Tos17* が挿入された対立遺伝子がホモ接合体となった個体 (-/-) では、特定遺伝子の産物が正常に発現しない可能性があり、機能欠損変異体として有力な候補となる。Funayama ら(2013)は、イネの *GS1;2* 遺伝子 (*OsGS1;2*) の第 2 エキソンに *Tos17* が挿入された突然変異体系統(NF6488)の子実を、農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターから入手後、*GS1;2* 欠損変異イネ系統 [NF6488(-/-): *gs1;2*] を獲得した。また、Funayama ら(2013)は、*GS1;2* 欠損変異体に、自己プロモーター制御下の *OsGS1;2* cDNA を再導入した相補系統(*gs1;2/OsGS1;2*)も獲得した。

冠水下の水田で栽培されるイネでは、根における NH_4^+ の吸収・同化と同化窒素の地上部輸送利用の効率や地上部における老化器官から発達中の若い器官への窒素の転流と再利用の効率が、イネの生長とコメの生産性を決定する(Yamaya and Kusano, 2014)。上記の *GS1;2* 欠損変異体では、根における NH_4^+ の初期同化の低下とともに、野生型と比較して約 6 割もの顕著な分げつ数の減少と、それによる穂数の減少が観察された(Funayama et al., 2013)。分げつの成長においては、先ず葉の葉腋に分裂組織(腋芽)が発生し、腋芽が伸長すれば分げつとなり、腋芽が休眠すると分げつは形成されない(Hoshikawa, 1989; Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012)。このように、分げつの成長は、「分裂組織を含む腋芽の形成」と「腋芽の伸長」の 2 段階で進行する(Hoshikawa, 1989)。分げつは、将来穂をつける「有効分げつ」と、穂をつけない「無効分げつ」とに分けられるため、穂数は必ずしも分げつ数とは一致しない(Hoshikawa, 1989)。しかしながら、分げつ数は、穂数に影響を与えるため、

イネの生産性において重要な表現型である。イネの栄養成長期において、窒素栄養が不十分だと有効分げつ数は減少し、窒素栄養が十分だと分げつ数が増加する(Mae, 1997; Sakakibara et al., 2006; Liu et al., 2011)。

腋芽は各葉の付け根に存在している。そのため、腋芽の形成・伸長が開始される4葉齢という幼植物においては、2葉および3葉の付け根に存在する第一腋芽および第二腋芽は、根と地上部の境より約5 mmという狭い領域(基部)に含まれる。これまでの研究(Tabuchi et al., 2007)では、GS1;2遺伝子は、主に根で発現しており、葉鞘や葉身での発現はわずかであることが明らかにされている。さらに、根におけるGS1;2の細胞分布を解析したところ、根の表層の表皮・外皮細胞におけるNH₄⁺供給依存的なmRNAの蓄積が示されている(Ishiyama et al., 2004)。しかしながら、腋芽や節および茎頂分裂組織を含む地上部の基部におけるGS1;2の組織・細胞分布に関しては、全く知見がなかった。

また、地上部最低部の基部は、地上部が倒伏しないように物理的に高い強度が必須であり、リグニン蓄積による木化が重要だと考えられる(Hanson and Havir, 1981; Sakurai et al., 2001)。さらに、イネでは、窒素栄養が不足するとデンプン粒が葉鞘に蓄積することが報告されている(Ohashi et al., 2000)。

そこで、本章の研究では、まず、GS1;2欠損変異体の分げつ数減少が、アンモニウム態窒素給源濃度に応答した表現型かどうか、また、腋芽の形成阻害によるものか、伸長抑制によるものかを明らかにするために、アンモニウム供給下のGS1;2欠損変異体イネの第一腋芽の観察および栄養成長期初期における分げつ数の継時的な測定を行った。そして、続いて、腋芽の伸長とGS1;2の機能の関連性を明らかにするために、腋芽が形成される地上部の基部を用いて、*in situ* hybridization解析を行い、GS1;2の基部中の組織・細胞分布を解析した。また、地上部基部のGS1;2の生理学的役割を詳細に考察するために、GS1;2欠損変異体の基部でのリグニン・デンプン粒蓄積や窒素・炭素含量の解析を行った。さらに、理化学研究所環境資源科学研究センター(現 筑波大学生命環境科学研究科)の草野都博士との共同研究により、GS1;2欠損変異体の幼植物地上部基部での遺伝子発現変動と代謝物を網羅的に解析し、GS1;2欠損変異体基部における代謝的变化を再検討した。

第二節 材料と方法

(1) 植物材料

イネの *GS1;2* 遺伝子の第 2 エキソンに *Tbs17* が挿入された *GS1;2* 欠損変異イネ系統 [NF6488(-/-): *gs1;2*] および *GS1;2* 欠損変異体に、自己プロモーター制御下の *OsGS1;2* cDNA を再導入した相補系統(*gs1;2/OsGS1;2* line 1) (Funayama et al., 2013)ならびに遺伝背景の日本型イネ栽培品種日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) (野生型: WT)を用いた。

(2) 栽培条件

初めに、種子を、比重 1.13 の塩化ナトリウム溶液を用いて選抜(塩水選)した。塩水選により沈降した種子を集め、水洗により塩分の除去を行った後、一晩の風乾を行った。丸型シャーレ(直径 9 cm)に、選抜した種子を系統ごとに敷き詰め、水に浸る状態で、30℃の暗所で 2 日間インキュベートし、発芽させた。

イネの栽培は、本学本農学研究科実験圃場の P1P 閉鎖系ガラス温室内で水耕法により行った。P1P 温室の環境設定は、温度は 26℃一定、日長時間は 14 時間とし、5 時 30 分から 18 時 30 分までは補助光を点灯した。窒素源を 0.1 mM、0.2 mM、0.25 mM、1 mM または 2 mM NH_4Cl として、Mae と Ohira (1981) の方法に従って調製した 1 強度水耕液を用いた。発芽した種子を、“のりパネ”(2 枚の発砲スチールを 10 cm×10 cm に成型し、その間にサランネットを挟み糊付けし、水に浮かぶようにしたもの)に置床した後、発芽後 19 日目までは、3 L ポリビーカーに、水耕液を 3 L 使用し、水耕液にのりパネを浮かした状態を保ちながら栽培を行った。水耕液は、毎週交換した。

分げつ数の計測および葉齢の計測を行った植物は、以下の通りに栽培を行った。発芽した種子を系統ごとに、発芽して 20 日後まで上記のように栽培し、その後、4 L ワグネルポット内にバーミキュライトを満たしたものに移植を行った。移植は、1 ワグネルポットにつき 2 個体とし、6 ワグネルポットを 1 つのバット(容量 12 L, 巾 27 cm × 長さ 47 cm × 高さ 21 cm, Thanko Co. Ltd., Tokyo, Japan)内で、上記の水耕液を用いて、栽培を行った。水耕液の交換は、週一回の間隔で行った。但し、水耕液交換前に水耕液が減り、イネの地上部基部が露出するような時は、水道水を追加した。

腋芽の観察や *in situ* hybridization、免疫染色、リグニン染色、でんぷん粒の染色、全窒素量および全炭素量の測定、アミノ酸とデンプンおよびスクロースの定量には、4 葉齢期の野生型、*GS1;2* 欠損変異体、そして相補系統の地上部基部を用いた。幼植物より根および第 1 葉、第 2 葉を取り除き、地上部と根の境より約 5 mm の長さに切り取った地上部を「基部」と定義し、実験に用いた。マイクロアレイ解析およびメタボローム解析には、3 葉齢期または 4 葉齢期において、野生型、*GS1;2* 欠損変異体、そして相補系統の地上部の基部をサンプリングし、液体窒素を用いて凍結保存して、実験に供試した。

(3) 分げつ数の測定

野生型および GS1;2 欠損変異体を用いた。分げつ数は、各葉の付け根に形成される腋芽が伸長し、主桿の親となる葉から、分げつの葉が目視できるまで伸長したものを、1 分げつとして計測した。なお、「一次分げつ」や「二次分げつ」、および、「無効分げつ」や「有効分げつ」等の区別は行わなかった。

(4) 腋芽の長さの観察

野生型、GS1;2 欠損変異体および相補系統を用いた。3 葉齢から 6 葉齢期のイネ幼植物から根と種子および 2 葉を取り除いて、2 葉の付け根にある腋芽（第一腋芽）を観察した。実体顕微鏡(Leica MZ125, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)および、デジタルカメラ(Canon EOS X6i, Canon Inc., Tokyo, Japan)を用いて、地上部基部の形態を観察し、コンピュータのソフト(Adobe illustrator CS5, Adobe Systems Inc., California, USA)上で長さを測定した。

(5) 全窒素量と全炭素量の測定

野生型および GS1;2 欠損変異体の地上部基部を、80℃の通風乾燥機にて 1 週間かけて完全に乾燥させた。乾燥重(DW)を測定した後、サンプルの入った 2 ml チューブにジルコニアビーズ(AS One Corporation, Osaka, Japan)を入れ、マルチビーズショッカー (MB601U, YASUI KIKAI Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて粉碎した。粉碎後、試料は、デシケータの中で保管した。1 mg の粉碎サンプルを正確に秤量し、ピンセットで錫箔 (76.9811.26, 0.15 ml, $\phi = 5$ mm, Ludiswiss, Flawil, Switzerland) に包埋した。これらのサンプルを Tamura ら (2010) と同様に、元素分析装置 (FLASH2000, Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) に供試し、全窒素量および全炭素量を測定した。

(6) *in situ* hybridization 解析

(a) *OsGS1;2*, *OsGS1;1* または *OsNADH-GOGAT* の RNA プロブの作成

in situ hybridization 法に用いた probe を次の通りに作成した。

鋳型 plasmid から、PCR によって鋳型を増幅するか、または、鋳型 plasmid を直接制限酵素で 1 か所切断することで、*in vitro* transcription に供する鋳型を得た。エタノール沈殿後、RNA polymerase を用いて *in vitro* transcription を行った。この時に、uracil に digoxigenin (DIG) が付加した labeling dNTP を用いることで、DIG ラベルされた RNA probe を作成した。この操作には DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用いた。

具体的には、次の操作を行った。

OsGS1;2 と *OsGS1;1* の cDNA を挿入した鋳型 plasmid (Ishiyama et al., 2004) から、それぞれの遺伝子特異的な primer (*OsGS1;1*, 5'-AGCGGCTTCTTGACGCCACG-3';

OsGS1;2, 5'-CAAAAGCTGGAGCTGGGGGAA-3') および M13 Forward primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')によって antisense 鎖 RNA probe 用の鋳型 DNA 断片を PCR によって増幅した。また、同様に、遺伝子特異的な primer (*OsGS1;1*, 5'-ACTTCTCCAGCACAAATGC-3'; *OsGS1;2*, 5'-GACTCACTATAGGGCGAATT-3')および M13 Reverse primer (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')によって sense 鎖 RNA probe 用の鋳型 DNA 断片を PCR によって増幅した。そして、それぞれの鋳型に対して、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて antisense 鎖 RNA probe を、T3 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて sense 鎖 RNA probe を作成した。また、*OsNADH-GOGAT1* の cDNA を挿入した鋳型 plasmid (Ishiyama et al., 2003) を、*Hind*III 消化後、T3 RNA polymerase を用いて antisense 鎖 RNA probe を、同様に *Bam*H I 消化後、T7 RNA polymerase を用いて sense 鎖 RNA probe を作成した。作成した probe は、濃度を検定したのち、*in situ* hybridization 法に用いた。ただし、Ishiyama ら(2003)では、この probe を *NADH-GOGAT1* に特異的な probe だとしているが、実際は、*NADH-GOGAT2* と相同な配列を持つ領域があるため、*NADH-GOGAT1* だけでなく *NADH-GOGAT2* もおそらく認識していると考えられた。そのため、本研究では *NADH-GOGAT* の probe だと記載した。

作成した probe の濃度検定を、以下の通りに行った。
エタノールおよび、PBST 溶液 [1×PBS and 0.1% (w/v) Tween 20] (10×PBS [1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 81 mM NaHPO₄·12H₂O and 14.7 KH₂PO₄])で緩衝化した PVDF 膜 (Immobilon-P, IPVH304F0, Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)に、作成した RNA probe を段階的に希釈して、1 μL ずつドット状に滴下した。同時に、DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)に含まれる DIG-labeled Control RNA をスタンダードとして、同様に段階的に希釈して、1 μL ずつ滴下した。滴下すると直ちに膜に吸収、吸着される。ついで、Blocking One (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)に 30 分間浸したのち、PBST 溶液で 1/5,000 に希釈した Anti-Digoxigenin-alkaline phosphatase (AP) Fab fragments (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用いて 1 時間一次抗体反応に供した。その後、PBST 溶液によって、余剰抗体を洗い流した(10 分間×3 回)。最後に、AP 緩衝液 [0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1M NaCl and 5mM MgCl₂]に 5 分間浸し、膜を緩衝化し、基質溶液 [0.338%(v/v) nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and 0.35%(v/v) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) in AP buffer]を用いてシグナルが検出されるまで検出反応を行った。スタンダードのシグナル強度と各 probe のシグナル強度を比較することで、スタンダードの濃度より各 probe の濃度を概算した。

(b) *in situ* hybridization 法に供したサンプルの調製

サンプルをカミソリ(FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)にて、FAA 液中 [1.85% (v/v) formaldehyde, 5% (v/v) acetic acid and 63% (v/v) ethanol] に切り出した。切り出したサンプルは、FAA 溶液の組織への浸透を促すために、水流ポンプを用いて 15 分おきに 1 時間ほど穏やかに脱気し、4℃にて一晩静置した。その後、固定されたサンプルをパラフィン中に包埋するために、エタノールおよび 1-ブタノールを用いてサンプルの脱水操作を行った。具体的には、まず、FAA 溶液から 50% (v/v) エタノールに置換し室温で 1 時間振とうした後、1 時間ごとに脱水系列 1 液 [50% (v/v) ethanol and 10% (v/v) 1-butanol]、脱水系列 2 液 [50% (v/v) ethanol and 20% (v/v) 1-butanol]、脱水系列 3 液 [50% (v/v) ethanol and 30% (v/v) 1-butanol] と順番に溶液を置換していき、脱水系列 3 液を入れたところで水流ポンプを用いて、15 分おきに 1 時間ほど穏やかに脱気した。ついで脱水系列 4 液 [40% (v/v) ethanol and 50% (v/v) 1-butanol]、脱水系列 5 液 [25% (v/v) ethanol and 75% (v/v) 1-butanol] と順番に溶液を置換していき、パラフィン中で組織を見やすくするために、脱水系列 5 液中に Eosin Y (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を飽和するまで適量添加して赤く染色し、一晩、室温で振とうした。翌日、脱水系列 5 液から 100% (v/v) 1-ブタノールに置換し、約 3 時間おきに 1-ブタノールを 3 回交換した。その後、1-ブタノールが入った状態のまま、60℃で溶解したパラフィン(Sigma-Aldrich Co., LLC., MO, USA)を 1-ブタノールと当量加え、チューブの蓋を開けて 60℃でさらにインキュベートした。これにより、1-ブタノールを蒸発させ、1-ブタノールからパラフィンへと置換した。6 時間以上の間隔で 3 日間かけて、パラフィンを交換していき、1-ブタノールの匂いがしなくなったら、パラフィンを固化させて 4℃で保管した。

4℃で保管したサンプルを、60℃の恒温槽にて再度液化させ、1 サンプルずつ包埋皿(tissue exam cassette, URAZUMI, Osaka, Japan)中で包埋し、ミクロトーム (Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Saitama, Japan)を用いて、8 μm の厚さの切片を調製した。ミクロトームによってリボン状につながって切れたサンプル(切片)を、黒い画用紙の上に並べ、実体顕微鏡 (Leica MZ125, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて組織を確認し、解析に供す部分のみ、選抜して切り出した。切片は、あらかじめスライドガラス (Super Frost Micro Slide Glass, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan)に広げておいた水の上に浮かべ、48℃から 50℃にした伸展機 (Ikemoto Scientific Technology Co., Ltd., Tokyo, Japan)の上に数分置くことで、十分に伸展させた。切片が伸展したところで、スライドガラス上の水を取り除き、ひと晩、約 50℃の伸展機の上で乾燥させ、切片をスライドガラスへと完全に貼付した。

(c) *in situ* hybridization 法による *OsGS1;2*, *OsGS1;1* または *OsNADH-GOGAT* mRNA の細胞分布解析

in situ hybridization 法解析は以下の工程で操作した。

1 日目

1. 脱パラフィン処理
2. 親水処理
3. proteinase 処理
4. 再固定処理
5. アセチル化処理
6. 乾燥
7. probe の hybridization 反応

2 日目

1. 余分な probe の除去 (洗浄)
2. ブロッキング処理
3. 抗体反応
4. 余分な抗体の除去 (洗浄)
5. 検出反応

染色槽を用いて、切片を貼付したスライドガラスをキシレン中に 30 分間、2 回浸し、パラフィンを完全に取り除いた(脱パラフィン処理)。ついで、100% (v/v) エタノールに 5 分間、2 回浸し、その後、水流ポンプを用いて 20 分間穏やかに脱気することで、スライドガラスを乾燥させた。乾燥したら、各 2 分間ずつ、100% (v/v) エタノール、90% (v/v) エタノール、70% (v/v) エタノール、50% (v/v) エタノールに浸し、最後に 5 分間、滅菌水に浸すことで、切片に親水処理を施した(親水処理)。ついで 37°C で 30 分間、proK 溶液 [0.1 M Tris-HCl (pH7.5), 0.05 M EDTA and 0.01%(v/v) proteinase K, recombinant PCR grade (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)]を用いて、切片のタンパク質を破壊することで、細胞中の mRNA をむき出しにして、probe が hybridize しやすくした(proteinase 処理)。proK 溶液を洗い流すために、5 分間滅菌水に浸した後、室温で 10 分間、再固定液 [4% (w/v) paraformaldehyde, 0.013N NaOH in 1×PBS]を用いて切片のタンパク質を再固定した(再固定処理)。そして、5 分間、滅菌水に浸したのち、切片上の電位を中性にし、目的以外の mRNA に probe が電氣的に hybridize することを防ぐためにアセチル化溶液 [1.3% (v/v) triethanolamine and 0.5% (v/v) acetic anhydride]に 20 分間浸した(アセチル化処理)。最後に、滅菌水に浸すことで、アセチル化溶液を洗い流した。そして、各 2 分間ずつ順次、50% (v/v) エタノール、70% (v/v) エタノール、90% (v/v) エタノール、100% (v/v) エタノールに浸し、再び、水流ポンプを用いて 20 分間穏やかに脱気することで、スライドガラスを乾燥させた(乾燥)。切片を乾燥させている間に、hybridization 溶液を準備した。1 スライドガラスあたりの組成は、次の通りである。

DIG-labeled RNA probe	3.75 ng (終濃度 25 pg/ μ L)
10 mg/mL Herring Sperm DNA (Promega Corporation)	7.5 μ L
10 mg/mL tRNA (Roche Diagnostics)	1.5 μ L
dH ₂ O	up to 15 μ L
Total	15 μ L

これらをチューブに準備し、80℃で 5 分、インキュベーションしてから、氷冷した後、55℃に保温しておいた Hybridization Solution (Sigma-Aldrich Co., LLC., St. Louis, USA) を 135 μ L 加えて、hybridization 溶液とした。この過程により、-20℃で保存しておいた probe を一本鎖にし、切片上の目的の mRNA に hybridize しやすくした。次に、乾燥したスライドガラスに hybridization 溶液を滴下し、ピペットマンを用いて切片を覆うように、溶液をまんべんなく広げた。さらに、その上に気泡が入らないように慎重にカバーガラス (Neo Micro Cover Glass, Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) をかぶせ、55℃の恒温槽に入れた湿潤箱中で、一晚反応させた (probe の hybridization 反応)。一晚反応後、スライドガラスを 60℃に加温した 4×SSC 溶液 (20×SSC 溶液[3 M NaCl and 0.3 M citric acid (pH7.0)]) 中に沈めることで、カバーガラスを外し、同溶液を用いて 5 分間、2 回洗浄し、hybridize していない probe を除去した。次に、TAE 溶液(50×TAE 溶液[2 M Tris, 1 M acetic acid and 50 mM EDTA · Na₂ · H₂O]) に 5 分間浸し、緩衝化後、30 分間、100V で Mupid2 plus (Mupid Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて電気泳動を行い、非特異的に hybridize した probe を電氣的に除去した。さらに、55℃に加温した 0.1×SSC、0.1% (w/v) SDS 溶液に 30 分間、2 回浸して余分な probe を洗浄除去した。その後、PBST 溶液で緩衝化し、抗体反応に供す前にブロッキングを行った。ブロッキング前に、切片をパップペン (Liquid Blocker Super PAP PEN, Daido Sangyo Co., Ltd., Saitama, Japan) を用いて疎水膜で囲んだ。ブロッキングは PBST 溶液で希釈した 1.5% (v/v) ヤギ正常血清 (Vectastain Goat Normal Serum, VECTOR LABORATORIES, INC., Cambridgeshire, UK) を用いて、湿潤箱中にて室温で 1 時間行った (ブロッキング処理)。その後、ブロッキング溶液を除き、PBST 溶液で 1/500 に希釈した Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) を用いた抗体反応を湿潤箱中にて室温で 1 時間行った。PBST 溶液を用いて、5 分間、3 回洗浄した [余分な抗体の除去 (洗浄)] 後、AP 緩衝液に 5 分間浸し、切片を緩衝化し、NBT/BCIP 基質溶液を用いて湿潤箱にて検出反応を行った (検出反応)。1 時間ごとに検鏡し、シグナルが検出できたら、水に浸して基質溶液を洗い流した。検出後、光学顕微鏡 (Leica DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) および CCD カメラ (Leica DFC 500, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて、画像を撮影した。

(7) 免疫染色法による GS1 タンパク質の細胞分布解析

切片の調製は、本章本節(6)(b)と同様に行った。切り出した切片は、*in situ* hybridization

法と同様の方法で、脱パラフィンおよびエタノールを用いた親水処理を行った。親水処理の後、Blocking 溶液[2% (w/v) ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) in 1×PBS]を用いて Blocking し、1 次抗体を用いて 37℃で 1 時間、抗体反応を行った。1 次抗体は、PBS 溶液で 1/10 に希釈したアフィニティー精製ウサギ抗イネ GS1 抗体 (Sakurai et al., 2001)を用い、ネガティブコントロールとして、PBS 溶液で 1/2,000 に希釈したウサギ正常 IgG (Sakurai et al., 2001)を用いた。PBS 溶液で 5 分間、3 回洗浄して余分な抗体を洗い流し、さらに、150 μ L のヤギ正常血清(VECTOR LABORATORIES, INC., Cambridgeshire, UK)と 50 μ L のビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (VECTOR LABORATORIES, INC., Cambridgeshire, UK)を 10 mL の PBS 溶液中で混和した 2 次抗体溶液を用いて、37℃で 1 時間の抗原抗体反応を行った。PBS 溶液中での 5 分間、3 回の洗浄で余分な抗体を洗い流し、アビジン DH (A 溶液 100 μ L)およびビオチン標識ペルオキシダーゼ H (B 溶液 100 μ L)を 5 mL の PBS 溶液中で混和した ABC 試薬(VECTASTAIN *Elite* ABC Rabbit IgG Kit, VECTOR LABORATORIES, INC., Cambridgeshire, UK)を滴下し、室温で 1 時間反応を行った。ついで、PBS 溶液にて 5 分間、3 回の洗浄後、DAB SUBSTRATE kit (VECTOR LABORATORIES, INC., Cambridgeshire, UK)を用い、DAB 溶液[0.02% (v/v) H₂O₂ and 0.1% (w/v) diaminobenzidine tetrahydrochloride in 0.1M Tris-HCl (pH7.2)]を滴下して検出を行った。検出を始めて 5 分でシグナルが検出されたので、水洗の後、光学顕微鏡(Leica DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)および CCD カメラ (Leica DFC 500, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて、撮影した。

(8) リグニン、デンプン粒、および組織の染色

リグニン染色は、Sakurai ら(2001)の方法に従い、サンプリング後にカミソリを用いて薄切りにした生のサンプルを用いて、組織に沈着したリグニンを phloroglucin-HCl [45% ethanol, 4 M HCl and 1.5% (w/v) phloroglucinol]溶液によって染色した。そして、実体顕微鏡(Leica MZ125, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)およびデジタルカメラ (Canon EOS X6i, Canon Inc., Tokyo, Japan)を用いて撮影した。デンプン粒の染色は、Mérida ら (1999)の方法に従って、FAA 溶液で固定し、パラフィンに包埋した地上部基部を Lugol 溶液[5% (w/v) iodine and 10% (w/v) potassium iodide]で染色した。また、組織を観察するために、Hayakawa ら(1994)の方法に従って、FAA 溶液で固定し、パラフィンに包埋した地上部基部を 0.05% (w/v) toluidine Blue O を用いて染色した。デンプン粒および組織の撮影は、染色後、光学顕微鏡(Leica DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)および CCD カメラ (Leica DFC 500, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を用いて行った。

(9) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、本研究室にて、幼植物を栽培し、サンプリングした後、理化学研

研究所環境資源科学研究センターの草野都博士(現 筑波大学生命環境科学研究科)と福島敦史博士に解析を依頼した。3 葉齢または 4 葉齢の野生型および GS1;2 欠損変異体の地上部基部より RNAeasy plant kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて RNA を抽出した。抽出された RNA を逆転写し、Albinsky ら (2010)の方法と同様に GeneChip Rice Genome Array (Affymetrix, Inc., CA, USA)を用いてトランスクリプトーム解析に供した。アクセッション番号を GSE62124 として、全データを the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (Craven-Bartle et al., 2013)に登録した。トランスクリプトーム解析結果のプロブセルの強度データをまとめた CEL file は、robust multi-chip average 法(Bolstad et al., 2003)を用いて補正した。また、AFFYPLM package プログラム(Bolstad et al., 2005)を用いて、データの品質確認を行った。アノテーション解析は、イネ CSV file(na33.annot.csv released by Affymetrix.)の最新のアノテーションに基づいた。

トランスクリプトーム解析によって得られた結果は、多重検定(Benjamini and Hochberg, 1995)および、これを補正する false discovery rate (FDR)を求める LIMMA (Smyth, 2005)を用いて、遺伝子の発現変動の有無の検定を行った。発現が増加した遺伝子および減少した遺伝子は、t-test ($FDR < 0.05$)および fold change ($|\log_2| > 1.5$)によって選抜された。3 葉齢期と 4 葉齢期の野生型基部を比較すると、1067 遺伝子に発現の変動があった。一方、3 葉齢期と 4 葉齢期の GS1;2 欠損変異体基部を比較すると、254 遺伝子に発現の変動があった。これらを重複する遺伝子を考慮して統合すると、1193 遺伝子(遺伝子群 A)であり、これら遺伝子が、野生型または GS1;2 欠損変異体の基部において 3 葉齢から 4 葉齢に成長することで発現変動したことになった。また、4 葉齢期の野生型および GS1;2 欠損変異体の基部を比較すると、1053 遺伝子(遺伝子群 B)に発現の変動があった。これら遺伝子群の A および B のなかに、4 葉齢期の基部において観察される GS1;2 欠損変異体の表現型を説明する遺伝子が含まれるとして、遺伝子群 A および B に重複して含まれた 578 遺伝子を選抜した。MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>) (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005) using annotated probe set Osa_AFFY_150909 を用いて、最終的に選抜された 578 遺伝子のオントロジーおよび pathway 解析を行った。遺伝子は、the Wilcoxon rank sum test を用いて、MapMan において BINs と呼ばれる遺伝子機能ごとのカテゴリーに分類された。MapMan によって、gene chip 上の全 51,279 転写産物は 34 の BINs に分類された。ただし、いくつかの遺伝子は重複して異なる BINs に分類された。

(10) メタボローム解析

本研究室にて、野生型および GS1;2 欠損変異体を 3 葉齢または 4 葉齢期まで栽培し、地上部基部をサンプリングした後、理化学研究所環境資源科学研究センターの草野都博士(現 筑波大学生命環境科学研究科)にメタボローム解析を依頼した。Kusano ら(2007; 2011)の方法と同様に、10 mg 新鮮重(FW)から 55 mg FW のサンプルより代謝物を抽出し、GC-TOF

MS (Agilent 6890N gas chromatograph, Pegasus 4D TOF-MS, LECO, MI, USA)を用いてメタボローム解析を行った結果、114 個の代謝物ピークが同定された。Redestigm ら(2009)の方法と新鮮重によって、得られたデータを正規化した。線形モデルを使った統計解析手法(LIMMA 解析)を用いて、代謝物ごとに野生型と GS1;2 欠損変異体間の変動の有無を検定した。さらに、増加あるいは減少した代謝物を、 t -test (FDR < 0.05)および fold change ($|\log 2| > 1.5$)によって選抜した。

(11) 地上部基部の遊離アミノ酸の定量

-80°Cで凍結保存していた地上部基部をジルコニアビーズとマルチビーズショッカー(MB601U, YASUI KIKAI Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いて粉砕した。粉砕後、試料に、新鮮重の10倍容の10 mM HClを添加し、再びマルチビーズショッカーを用いて混和した後、15,000 rpm で室温、15 分間遠心分離した。上清をフィルターカップ(Ultra free-MC 5000 NWWL Filter Unit, Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)へと移し、さらに15,000 rpm で室温、15 分間遠心分離処理した。この溶出液を地上部基部のアミノ酸抽出液とした。

得られたイネの基部のアミノ酸抽出液は、AccQ•Tag Ultra Derivatization Kit (Waters Corporation, Massachusetts, USA)を用いて、遊離の NH_4^+ とアミノ酸の誘導体化を行った。まず、AccQ•Tag Ultra Reagent powder のバイアル瓶に、1 ml の AccQ•Tag Ultra Reagent Diluent を加え、55°C に設定したヒートブロック上で10 分間加熱し、誘導体化試薬を調製した。その後、1.5 ml 容チューブに10 μl のアミノ酸抽出液と30 μl の AccQ•Tag Ultra Borate Bufferを加え、1 秒間、ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2 : Scientific Industries, Inc., NY, USA) で激しく攪拌した。その後、調製した誘導体化試薬を10 μl 加え、10 秒間、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。1 分間、室温で誘導体化反応を行った後、55°C に設定したヒートブロックで、10 分間インキュベートし、反応を停止させた。AccQ•Tag でラベル化したサンプルは室温で保存し、Konishi ら(2014)の方法に従って ACQUITY UPLC H-Class system [TUV Detector, AccQ • Tag Ultra column, Empower3 software (Cell_Culture_TUV_HCLASS1011method), Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan]を用いて、遊離の NH_4^+ とアミノ酸を分離・定量した。

(12) 地上部基部の遊離の糖の定量

本章本節(11)のアミノ酸抽出方法と同様に、HCl 抽出とフィルターカップ(Ultra free-MC 5000 NWWL Filter Unit, Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany)濾過処理により、地上部基部の遊離の糖画分を調製した。

得られた地上部基部の糖抽出液は、HPLC システム [305 Piston Pump、306 Piston Pump、Dynamic Mixer (Model 811D)、805 Manometric Module 附属 (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)]を用いて解析した。また、Trilution LC software (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)

により、HPLC を操作した。

糖(スクロース、フルクトース、グルコースおよびフルクトース 1,6 ビスリン酸)の分離には、COSMOSIL Sugar-D カラム(4.6 mm diameter x 250 mm length) (nacalai tesque, Kyoto, Japan)を用いた。糖抽出液から、5 μ L を HPLC のサンプルループ(最大容量 20 μ L)に注入し、20 分間、100% solvent A (acetonitrile : H₂O = 75 : 25)を流して糖を分離させ、15 分間、100% solvent B (100% acetonitrile)を流してカラムの洗浄を行った。最後に、10 分間、100% solvent A を流して、カラムの平衡化を行った。流速は、0.6 mL/分で行った。カラム温度は、Hot Pocket (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)を用いて、25°C に調節した。カラム内の圧力は、およそ 25 MPa とした。

以上の方法で分離された糖のピークを、UV/VIS-155 (Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)を用いて、192 nm の波長で検出し、Trilution LC software(Gilson, Inc., Middleton, WI, USA)で解析した。それぞれの糖は、1 μ g から 100 μ g の範囲において、検出値に直線性があった。

(13) 地上部基部のデンプンの定量

地上部基部のデンプンの定量には、F-kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用いた。 -80°C で凍結保存していた地上部基部をジルコニアビーズとマルチビーズショッカー (MB601U, YASUI KIKAI Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いて粉碎した。粉碎後、Dimethyl sulfoxide (DMSO)を加えて懸濁した試料を 15 mL チューブに移し、4 mL になるように DMSO を加えた。DMSO に懸濁された資料に、8 N HCl を 1 mL 加え、攪拌後、 60°C の恒温槽にて、45 分間、インキュベートした。その後、8 N NaOH を 1 mL 加え、さらに、15 mL になるように 0.112 M クエン酸緩衝液(pH 4.6)を加えた。これを、デンプン抽出液とした。

0.2 mL の溶液 1 [クエン酸緩衝液(pH 4.6)とアミノグルコシダーゼ(84U)]と、デンプン抽出液 0.1 mL を混合し、 60°C の恒温槽にて、15 分間、インキュベートした。続いて、0.75 mL の溶液 2 [triethanolamine 緩衝液(pH 7.6)、NADP⁺および ATP]および水 1 mL を加え、3 分間、室温にてインキュベートした。分光光度計を用いて、365 nm の波長を測定した(値 1)。その後、測定した溶液に、20 μ L の溶液 3 (ヘキソキナーゼおよびグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ酵素液を含む)を加え、室温にて、15 分間、インキュベートした。インキュベート後、再度、分光光度計を用いて、365 nm の波長を測定した(値 2)。値 1 と値 2 の差が、NADPH の増加量を表し、NADPH の増加量と係数 597 の積がデンプン量($\mu\text{g/mL}$)を表す。

(14) フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)の酵素活性の測定

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)の酵素活性の測定は、Olsen ら(2008)の方法を一部改変して以下のように行った。

-80°Cで凍結保存していた地上部基部と葉身を、本章本節(5)と同様に、ジルコニアビーズ (AS One Corporation, Osaka, Japan)を用いて粉碎した。粉碎後、新鮮重の 5 倍量の抽出液 [100 mM Tris-HCl (pH 8.8) with 12 mM β -mercaptoethanol]を加え、良く攪拌した後、4°C で 15,000 rpm 15 分間、遠心分離した。MicroSpin S-200 HR Columns (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)に上清を移し、再び遠心分離して脱塩処理した。この溶出液を用いて、次のように PAL 活性を測定した。

溶出液 500 μ L に 100 mM Tris-HCl (pH 8.8) 450 μ L および 100 mM L-phenylalanine 50 μ L を加え、37°C で 60 分間、インキュベートした。インキュベート後、5 M HCl を 50 μ L 加え、酵素反応を停止させた。ブランクには、溶出液 500 μ L に 100 mM Tris-HCl (pH 8.8) 450 μ L および 5 M HCl 50 μ L を加え、最後に 100 mM L-phenylalanine 50 μ L を加えたものを用いた。分光光度計を用いて、290 nm の波長の吸光度を測定し、ブランクの値を差し引いた。10,000 L/mol/cm のケイ皮酸の吸光度の値を係数として、PAL の酵素活性を計算した。

第三節 結果

(1) NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体イネ幼植物の第一腋芽の観察と分げつ数の経時的測定

分げつは、腋芽の形成と腋芽の伸長の 2 段階の過程によって形成される。そこで GS1;2 欠損変異体の分げつ数の減少が「腋芽が形成されない」ことに起因するのか、または、「腋芽の伸長抑制」に起因するのかを明らかにするために、第 2 葉の付け根に発生する第一腋芽の成長を経時的に観察した。その結果、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した GS1;2 欠損変異体において、野生型と同様に腋芽の正常な形成が確認された(Fig. 2a-c)。しかし、この時、3 葉齢期から 5 葉齢期にかけて経時的に腋芽の長さを測定した結果、GS1;2 欠損変異体の腋芽において顕著な伸長抑制が観察された(Figs. 2b, e, h, 3)。一方、イネ GS1;2 遺伝子の自己プロモーター制御下のイネ GS1;2 cDNA を再導入した相補系統イネでは、腋芽の伸長が野生型と同程度にまで回復した(Figs. 2a, c, d, f, g, i, 3)。

続いて、アンモニウム態窒素給源濃度に応答した表現型かどうかを確認するため、窒素源を 0.1 mM、0.25 mM、1 mM NH_4Cl として水耕栽培を行い、5 葉齢期における第一腋芽の長さを測定した。その結果、野生型では、0.1 mM あるいは 0.25 mM NH_4Cl の低窒素条件では腋芽が伸長せず、1 mM NH_4Cl の充足窒素条件で腋芽の伸長が認められた(Fig. 4)。しかし、窒素充足条件における腋芽伸長が GS1;2 欠損変異体では認められなかった(Fig. 4)。

さらに、1 mM NH_4^+ 供給下で、より長期的(発芽後 50 日間)に GS1;2 欠損変異体を栽培し、定期的に分げつ数および葉齢を計測した(Fig. 5)。その結果、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体においては、分げつ形成期の初期である約 4 葉齢から分げつ数の減少が観察された(Fig. 5a)。また、GS1;2 欠損変異体は、野生型と比較し葉齢に差が生じなかったことより、生育速度に違いがないことが明らかとなった(Fig. 5b)。

その一方で、窒素源を 0.2 mM、1 mM、2 mM NH_4Cl として野生型を水耕栽培した結果、供給する NH_4^+ 濃度が低くなるにつれて、分げつ数が減少し、葉齢も低下した(Fig. 6)。従って、充足濃度 NH_4^+ 供給した GS1;2 欠損変異体イネでは、分げつ数が、野生型の低窒素条件と同じように減少するが、生育速度に関しては、野生型の低窒素条件の遅延する表現型を示さなかった。

以上の結果より、GS1;2 欠損変異体では、充足濃度の NH_4^+ 供給下での腋芽の伸長が、分げつ形成期の初期から抑制されることによって分げつ数の減少が生じることが明らかになった。

(2) イネ幼植物地上部基部における *OsGS1;2*, *OsGS1;1* および *OsNADH-GOGAT* の mRNA ならびに GS1 タンパク質の組織・細胞分布の解析

4 葉齢期のイネ幼植物地上部基部の維管束系構造モデルを Fig. 7 に示した。この構造モデルは、Hoshikawa (1989) VI 茎-2. 節・節間の内部構造-(6) 稈と葉・根の維管束連絡, pp146-147 における 9.0 葉齢期のイネの各器官の維管束連絡系模式図を基にして作成した。

稈の維管束は節部で葉と分げつおよび冠根の維管束と連絡する。葉身の大維管束(青線)と小維管束は、節部に入り込み、小維管束は辺周部維管束環(黄色線)と連絡し、大維管束は辺周部維管束の内側に入り込んで節間の縦走大維管束(青線)となる。ここで、葉の維管束は節部で稈の維管束となるが、2節間を下降して2枚下の葉に入る維管束と連絡する。また、大小維管束は、節基部において節網維管束(緑線)と連結する。分げつへの大維管束(赤線)は節網維管束と連絡する。また、冠根の維管束(黄色線)は辺周部維管束環から分岐する。

OsGS1;2 mRNA の組織・細胞分布を調べるために、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型、GS1;2 欠損変異体および相補系統の4葉齢期幼植物の地上部基部組織の縦断切片に対して、*OsGS1;2* mRNA に特異的な probe を用いた *in situ* hybridization 解析を行った(Fig. 8)。その結果、野生型では、*OsGS1;2* mRNA の強いシグナルが節網維管束の節部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束に検出され、また、*OsGS1;2* mRNA の弱いシグナルが茎頂分裂組織(SAM)や未抽出葉に観察された(Fig. 8a, e, i, m)。一方、GS1;2 欠損変異体では、それらのシグナルは検出されなかった(Fig. 8b, f, j, n)。正常な *OsGS1;2* cDNA を再導入した相補系統では、野生型と同程度のシグナルが同様な組織・細胞分布で検出された(Fig. 8c, g, k, o)。ネガティブコントロールとして用いた sense 鎖の probe では、シグナルはバックグラウンド程度であった(Fig. 8d, h, i, p)。

また、同様に *OsGS1;1* と *OsNADH-GOGAT* の mRNA の組織・細胞分布も調べた(Figs. 9, 10)。その結果、野生型の地上部基部において、*OsGS1;1* mRNA の強いシグナルは、SAM や腋芽および未抽出葉で検出され、*OsGS1;2* mRNA の強いシグナルが検出された節網維管束と地上部基部上部の大維管束そして分げつ大維管束では、*OsGS1;1* mRNA の弱いシグナルが検出された(Fig. 9a, c, e, g)。一方、*OsNADH-GOGAT* mRNA の強いシグナルは、縦走大維管束や分げつ大維管束の節部伴細胞・柔細胞で検出された(Fig. 10c, e)。また、*OsNADH-GOGAT* mRNA のシグナルは SAM、腋芽や未成熟葉でも観察された(Fig. 10a, g)。ネガティブコントロールの sense 鎖 probe のシグナルは、バックグラウンド程度であった(Figs. 9b, d, f, h, 10b, d, f, h)。

OsGS1;2 および *OsGS1;1* の mRNA の組織・細胞分布の結果を再検討するため、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型イネの4葉齢期幼植物の地上部基部組織の縦断切片に対して、GS1;1 および GS1;2 を認識する GS1 抗体(Sakurai et al., 2001)を用いて免疫染色を行った(Fig. 11)。GS1 タンパク質の存在を示す抗原抗体反応シグナルは、*OsGS1;2* mRNA および *OsGS1;1* mRNA の分布が認められた組織・細胞で検出され、特に *OsGS1;2* mRNA の強いシグナルが検出された節網維管束の節部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束で、GS1 タンパク質の存在を示す抗原抗体反応の強いシグナルが検出された(Fig. 11)。この結果は、イネ幼植物地上部基部における各 *OsGS1* mRNA の組織・細胞分布の結果の正当性を強く支持した。また、節網維管束の節部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束に蓄積した GS1 タンパク質は、主に *OsGS1;2* 遺伝子産物であることが示唆された。

(3) GS1;2 欠損変異体の幼植物地上部基部におけるリグニン・デンプン粒蓄積および窒素・炭素含量の解析

地上部の最底部である基部は、地上部が倒伏しないように物理的に強靱な組織であることが求められるため、リグニン合成が盛んな組織であると考えられる。リグニンのようなフェニルプロパノイドの合成過程の初期反応のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL; EC 4.3.1.24) 酵素反応において、 NH_4^+ が発生することが知られており(Fig. 18; Hanson and Havir, 1981)、GS1 が、PAL 酵素反応で発生する NH_4^+ の同化に関わる可能性が示唆されている(Sakurai et al., 2001)。

実際に、野生型イネ幼植物の葉と地上部基部の PAL の酵素活性を定量すると、葉身と比較して、地上部基部の PAL 酵素活性が約 20 倍高かった(Fig. 12)。従って、地上部基部の主な GS1 分子種である GS1;2 (Figs. 8a, e, i, m, 11c, e)が、PAL 酵素反応由来の NH_4^+ の再同化・解毒を担う可能性が考えられた。そこで、地上部基部における GS1;2 が果たしうる機能を評価するために、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型、GS1;2 欠損変異体および相補系統の 4 葉齢期幼植物の地上部基部組織の縦断切片を、phloroglucin-HCl 溶液により染色し、蓄積リグニンを観察した(Fig. 13)。野生型イネでは、縦走大維管束や節網維管束を含む基部下部においてリグニンの高蓄積が認められた(Fig. 13a, e)。また、リグニンの高蓄積は、基部上部の大維管束でも認められた。一方、GS1;2 欠損変異体では、上記の組織におけるリグニン蓄積量は顕著に減少し(Fig. 13b, f)、他方、相補系統では、リグニンの高蓄積が回復した(Fig. 13c, g)。これらの結果は、GS1;2 の存在・機能が、地上部基部節間のリグニン合成に関連することを示唆した。

また、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体の 4 葉齢期幼植物の地上部基部の全窒素含量と全炭素含量および乾燥重を比較すると、野生型と比較して GS1;2 欠損変異体で顕著に減少した (Fig. 14)。一方、窒素栄養が不十分な環境下において、イネは、デンプン粒を葉鞘に蓄積する(Ohashi et al., 2000)。1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した GS1;2 欠損変異体の 4 葉齢期幼植物の地上部基部の全窒素含量は、野生型と比較して著減していたため、さらに、デンプン粒に関して解析すると、GS1;2 欠損変異体の展開中の 3 葉または 4 葉の葉鞘にデンプン粒が著しく蓄積していた(Fig. 15)。これらの結果から、GS1;2 の欠損が、幼植物の地上部基部の窒素・炭素代謝を大きく変化させていることが明らかになった。

(4) GS1;2 欠損イネ変異体幼植物地上部基部における網羅的遺伝子発現変動解析

GS1;2 欠損変異体幼植物の地上部基部の代謝の変化をさらに詳細に検討するため、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体の幼植物の地上部基部において、マイクロアレイ法を用いた網羅的転写産物発現変動解析を行った。5 葉齢期の GS1;2 欠損変異体の腋芽伸長は、野生型と比較して大きく抑制されていたため、GS1;2 欠損変異体の地上部基部における通常の生育や腋芽の伸長に関わる遺伝子群の発現は、3 葉齢期から 4 葉齢期にか

けて既に変化していることが予想された(Figs. 2, 3)。そこで、3 葉齢と 4 葉齢の野生型および GS1;2 欠損変異体の地上部基部を用いてマイクロアレイ解析を行い、比較データの有意差検定 [t -test (FDR < 0.05)] 後、fold change $|\log_2| > 1.5$ の発現変動が認められた遺伝子群を選抜した。

3 葉齢期と 4 葉齢期の野生型基部を比較すると、1,067 遺伝子に発現変動が認められ、3 葉齢期と 4 葉齢期の GS1;2 欠損変異体基部を比較すると、254 遺伝子に発現の変動が認められた。遺伝子の重複を排除してこれらを統合すると、1,193 遺伝子(遺伝子群 A)が、野生型または GS1;2 欠損変異体の基部において 3 葉齢から 4 葉齢に成長することで発現変動したことになった。また、4 葉齢期の野生型および GS1;2 欠損変異体の基部を比較すると、1,053 遺伝子(遺伝子群 B)に発現の変動が認められた。遺伝子群 A および遺伝子群 B のなかに、4 葉齢期の GS1;2 欠損変異体の地上部基部において見られる代謝変化も含めた表現型を説明する遺伝子が含まれるとして、遺伝子群 A および遺伝子群 B に重複して含まれた 578 遺伝子を選抜した。MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>) (Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005) using annotated probe set Osa_AFFY_150909 を用いて、最終的に選抜された 578 遺伝子のオントロジー解析および pathway 解析を行い、the Wilcoxon rank sum test を用いて、遺伝子機能カテゴリー分類した。578 遺伝子は 34 のカテゴリーに分別され (Table 1, Fig. 16)、MapMan を用いて代謝マップ上に示した (Fig. 17)。その結果、アミノ酸、核酸、デンプンやショ糖などの合成、ペントースリン酸経路や TCA 回路、リグニン合成に関わる遺伝子の発現が GS1;2 欠損変異体の地上部基部で減少した (Fig. 17)。一方、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、光化学系や硫黄代謝のカテゴリーでのみ遺伝子発現が増加した。

ここで、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、*PAL* 遺伝子の発現は同レベルであったが、リグニン合成前駆体のメチル化反応を担う酵素であるカフェ酸 3-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) をコードする遺伝子やリグニンの前駆体を合成するラッカーゼをコードする遺伝子の発現が顕著に減少していた (Fig. 18)。これより、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、*COMT* 遺伝子やラッカーゼ遺伝子の発現抑制により、リグニン蓄積が著減していることが示唆された。また、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、デンプンを分解する α -アミラーゼと β -アミラーゼの各遺伝子の発現が減少し、かつ、ショ糖合成経路のサイトゾル型フルクトース 1, 6-ビスホスファターゼ (cFBP)、スクロースホスファターゼ (SPP)、スクロースシンターゼ (SuSy) およびヘキソキナーゼをコードする遺伝子の発現が減少していた (Fig. 19)。これより、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、デンプン分解とスクロース合成の抑制により、デンプン粒が蓄積したことが示唆された。

(5) GS1;2 欠損イネ変異体幼植物地上部基部における代謝物の網羅的解析

1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した 3 葉齢と 4 葉齢の野生型および GS1;2 欠損変異体の地上部基部において、飛行時間型質量分析計 (GC-TOF MS) を用いた代謝物の網羅的な解析を行っ

た(Figs. 20, 21)。メタボローム解析では、114 の代謝物ピークが同定された。そのうち、有意差検定[t -test (FDR < 0.05)]後、fold change $|\log_2| > 1.5$ の変動が見られた代謝物を、GS1;2 欠損によって、増加または減少した代謝物として選抜した。

その結果、野生型と GS1;2 欠損変異体の腋芽の長さに差がない 3 葉齢期において(Figs. 2a, b, 3)、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体では、8 個の代謝物が増加し、19 個の代謝物が減少した(Fig. 20)。野生型と GS1;2 欠損変異体の腋芽の長さに差がある 4 葉齢期においては(Figs. 2d, e, 3)、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体では、2 個の代謝物が増加し、26 個の代謝物が減少した(Fig. 21)。特に、4 葉齢では、GS1;2 欠損によって、GS1;2 反応による生成物である Gln を始め、アミノ酸類や、有機酸類、およびスクロースを含めた糖類が減少した(Fig. 21)。また、*p*-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸およびシナピン酸などの多くのリグニン誘導体が連なることでリグニンが形成されるが(Vanholme et al. 2010)、4 葉齢では、GS1;2 欠損によって、遊離のシナピン酸が蓄積した(Fig. 21)。

さらに、GS1;2 欠損による地上部基部での NH_4^+ の Gln への初期同化ならびにデンプン分解とスクロース合成の抑制をより詳細に再検討するため、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体および相補系統の幼植物の地上部基部における、アミノ酸と NH_4^+ および糖類とデンプンを定量した (Fig. 22)。その結果、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、 NH_4^+ 量が約 4 倍に増加し、Gln 量および Gln から合成される Asn (Lea et al., 2007; Gaufichon et al., 2010)量は約 50%減少した(Fig. 22a-c)。また、GS1;2 欠損変異体において、約 30%のスクロースの減少と、約 30%のフルクトース 1,6 ビスリン酸の増加および約 2 倍のデンプンの増加が認められた(Fig. 22d, e, h)。グルコース量とフルクトース量は、GS1;2 欠損変異体と野生型の間で、統計的に有意な差がなかった(Fig. 22f, g)。イネ *GS1;2* 遺伝子の自己プロモーター制御下のイネ *GS1;2* cDNA を再導入した相補系統の地上部基部では、Asn 量が野生型より減少したものの、 NH_4^+ 量と Gln 量ならびにスクロース量とフルクトース 1,6 ビスリン酸量およびデンプン量は、野生型と同程度に回復した(Fig. 22)。

以上から、GS1;2 欠損が、地上部基部の NH_4^+ 同化およびスクロース合成ならびにリグニン合成の低下を引き起こしていることが代謝産物レベルでも確認できた。



Figure 2. Stereoscopic microscope observation of the axillary bud in the primary tiller of wild-type rice (WT), the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) and the *gs1;2/OsGS1;2* complementation line during growth from the 3rd- to 5th-leaf stage. Rice plants were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4^+ in an outdoor greenhouse. Outgrowth of the axillary bud (arrowhead) in the second leaf was observed at the 3rd-leaf stage (a—c), 4th-leaf stage (d—f) and 5th-leaf stage (g to i). Scale bars = 0.25 mm (a—c) and 1.0 mm (d—i).

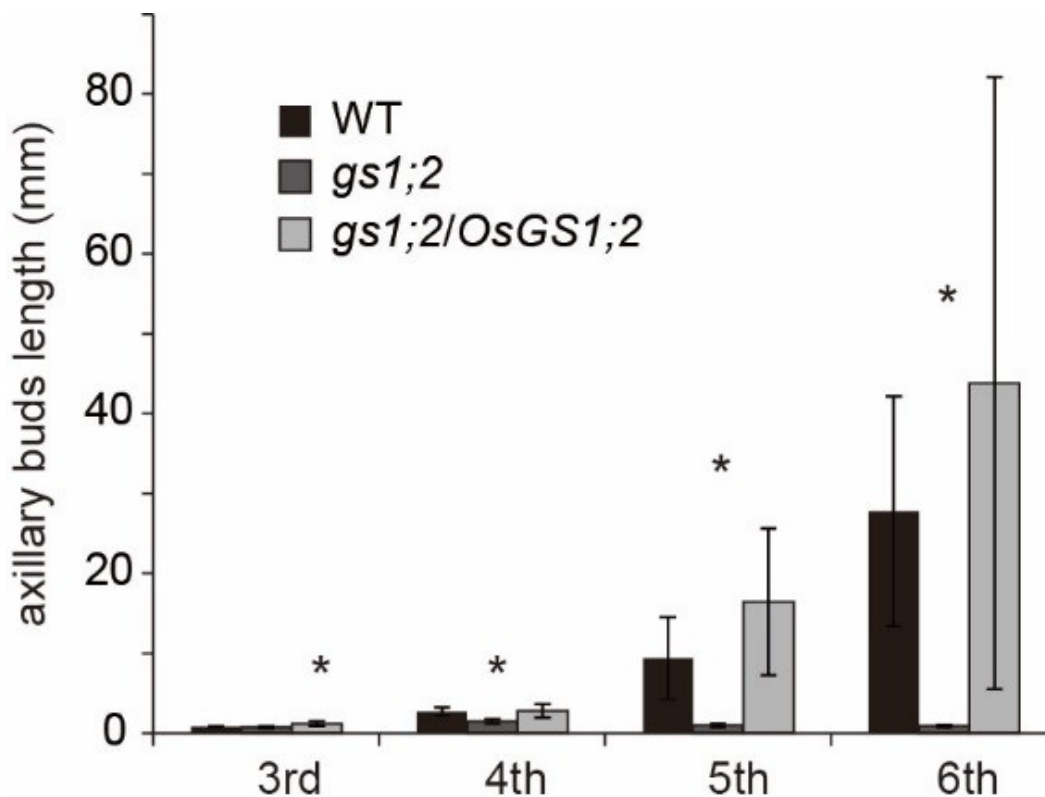


Figure 3. Longitudinal length of the axillary bud in the primary tiller of the 3rd internode in the 2nd leaf of wild-type rice (WT), the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) and the *gs1;2/OsGS1;2* complementation line during growth from the 3rd- to 6th-leaf stage. Mean values plus the standard error (SE) of four independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between the WT and *gs1;2* (* $P < 0.05$ according to the Student's t-test).

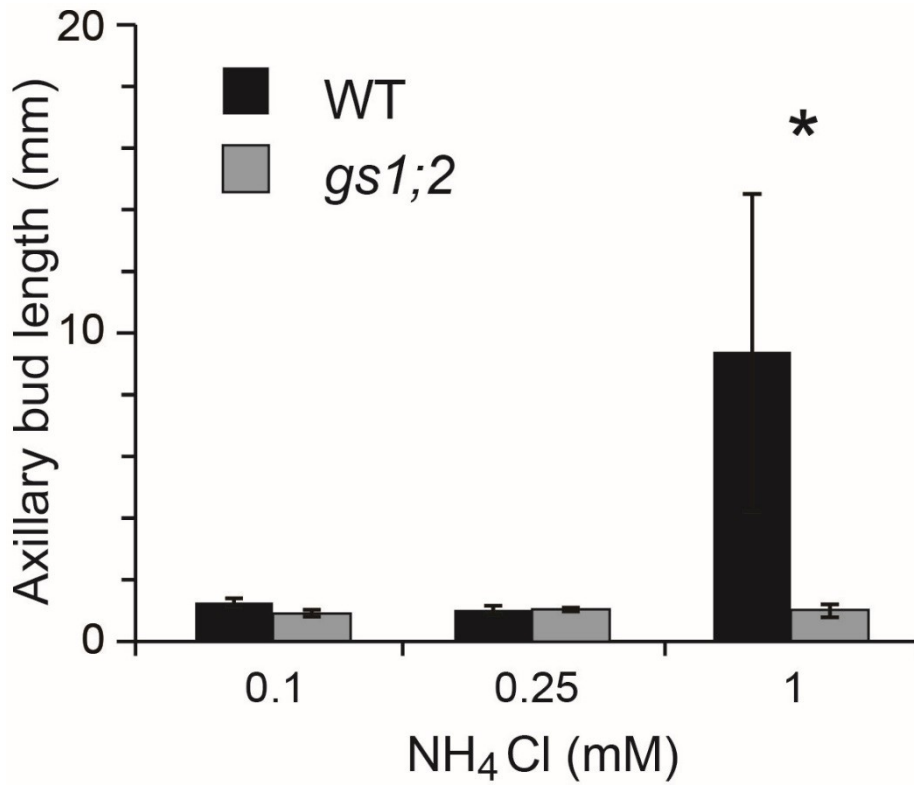


Figure 4. Differences in lengths of the axillary buds of wild-type rice (WT) and the *GS1;2* knockout mutant (*gs1;2*) grown hydroponically in the presence of insufficient (0.1 and 0.25 mM) or sufficient (1 mM) NH_4^+ . The longitudinal length of the axillary bud in the primary tiller of the 3rd internode in the 2nd leaf were measured at the 5th-leaf stage. Mean values plus the SE of eight to ten independent plants are indicated. The asterisk denotes the statistically significant difference between the WT and *gs1;2* (* $P < 0.05$ according to Student's *t*-test).

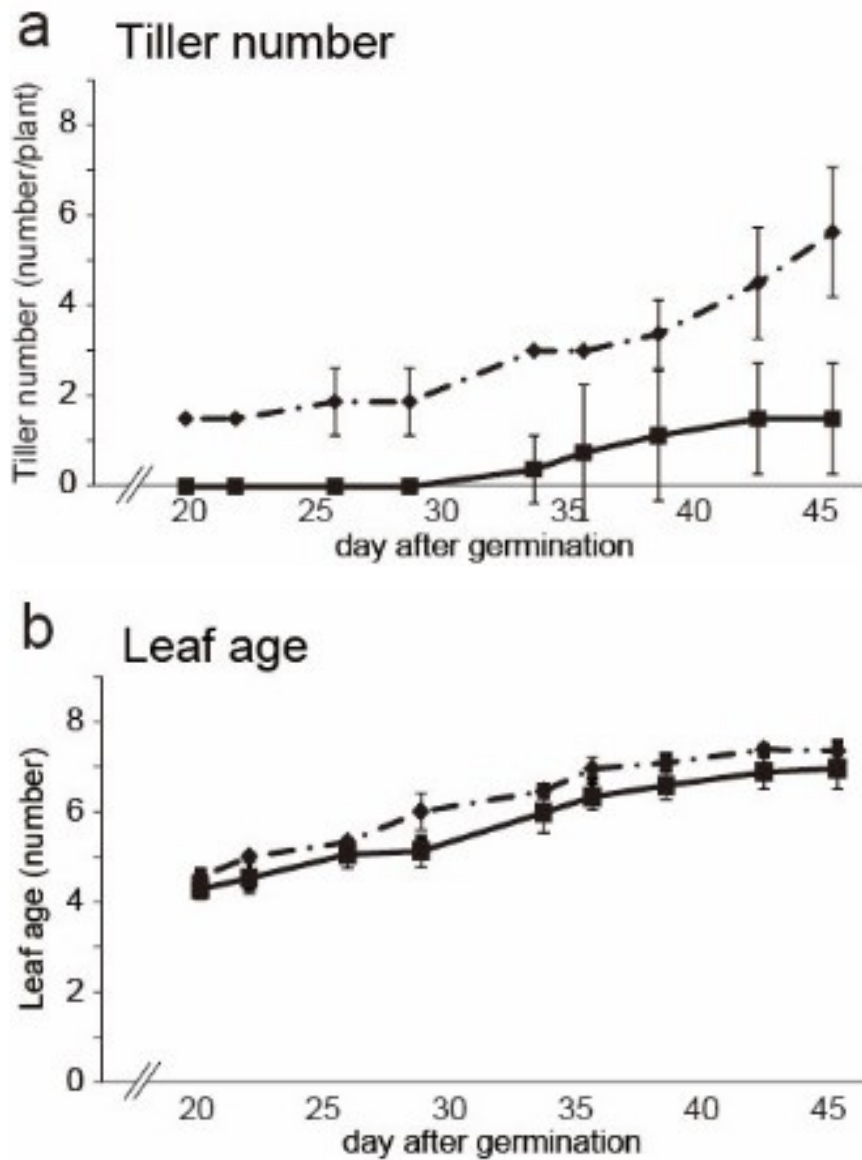


Figure 5. Tiller numbers (a) and leaf age (b) during growth of wild-type rice (WT: dashed line) and the *GS1;2* knockout mutant (*gs1;2*: straight line) in the presence of 1 mM NH_4^+ . Rice plants were grown hydroponically in an outdoor greenhouse for 46 days after germination. Mean values plus the standard deviation (SD) of four independent plants are indicated.

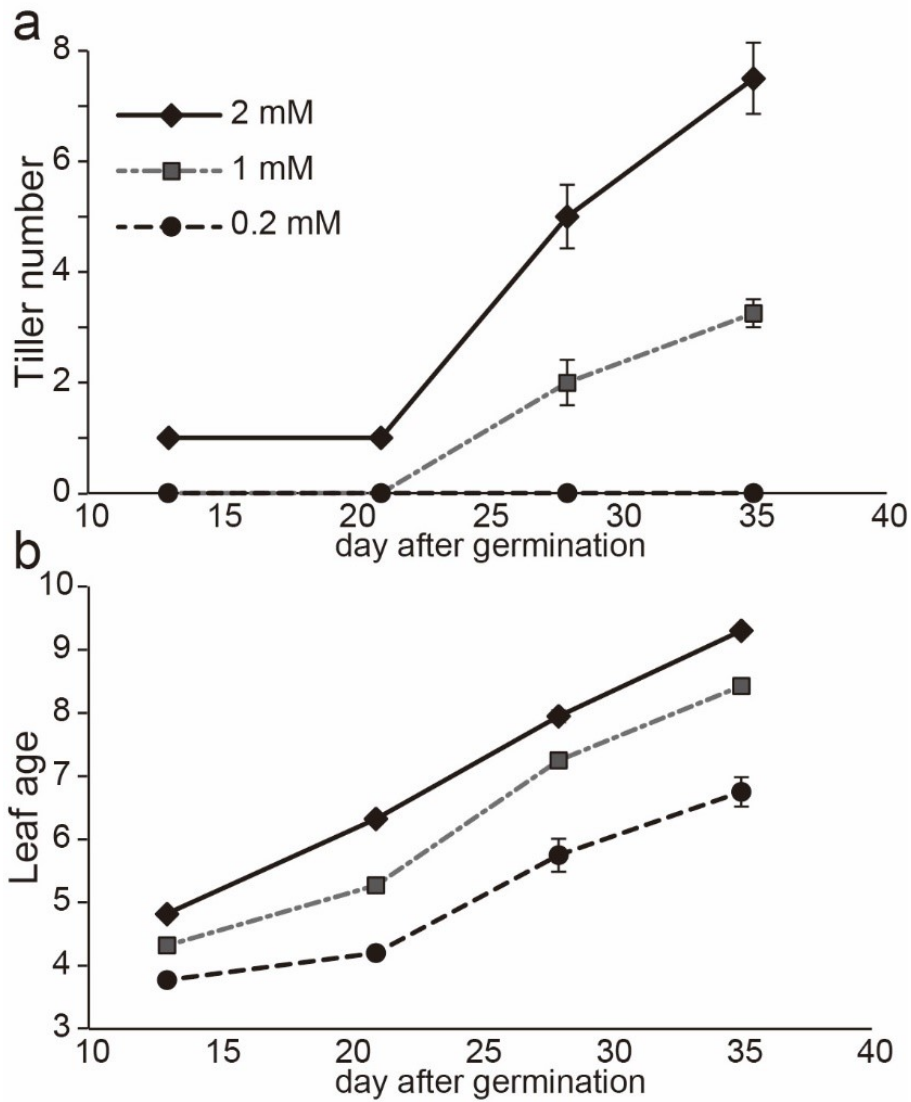


Figure 6. Tiller numbers (a) and leaf age (b) during growth of wild-type rice in the presence of 0.2 mM (dotted line), 1 mM (dashed line) or 2 mM NH_4^+ (straight line). Rice plants were grown hydroponically in an outdoor greenhouse for 35 days after germination. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated.

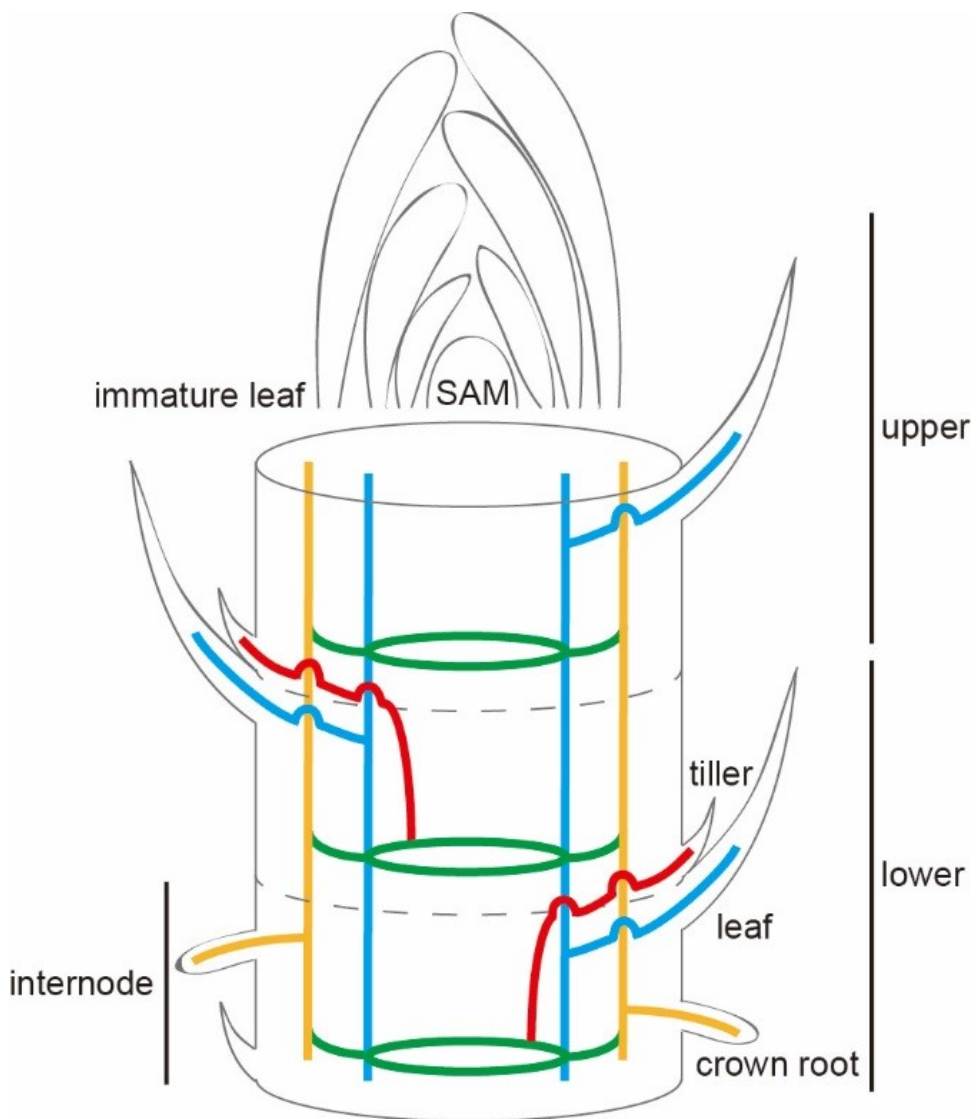


Figure 7. Schematic model of vascular bundle (VB) in the shoot basal part of rice, according to the illustration by Hoshikawa (1989) with slight modification. Blue lines, large VB; yellow lines, peripheral cylinder of VB; red lines, large VB of tiller; and green lines, nodal vascular anastomoses.

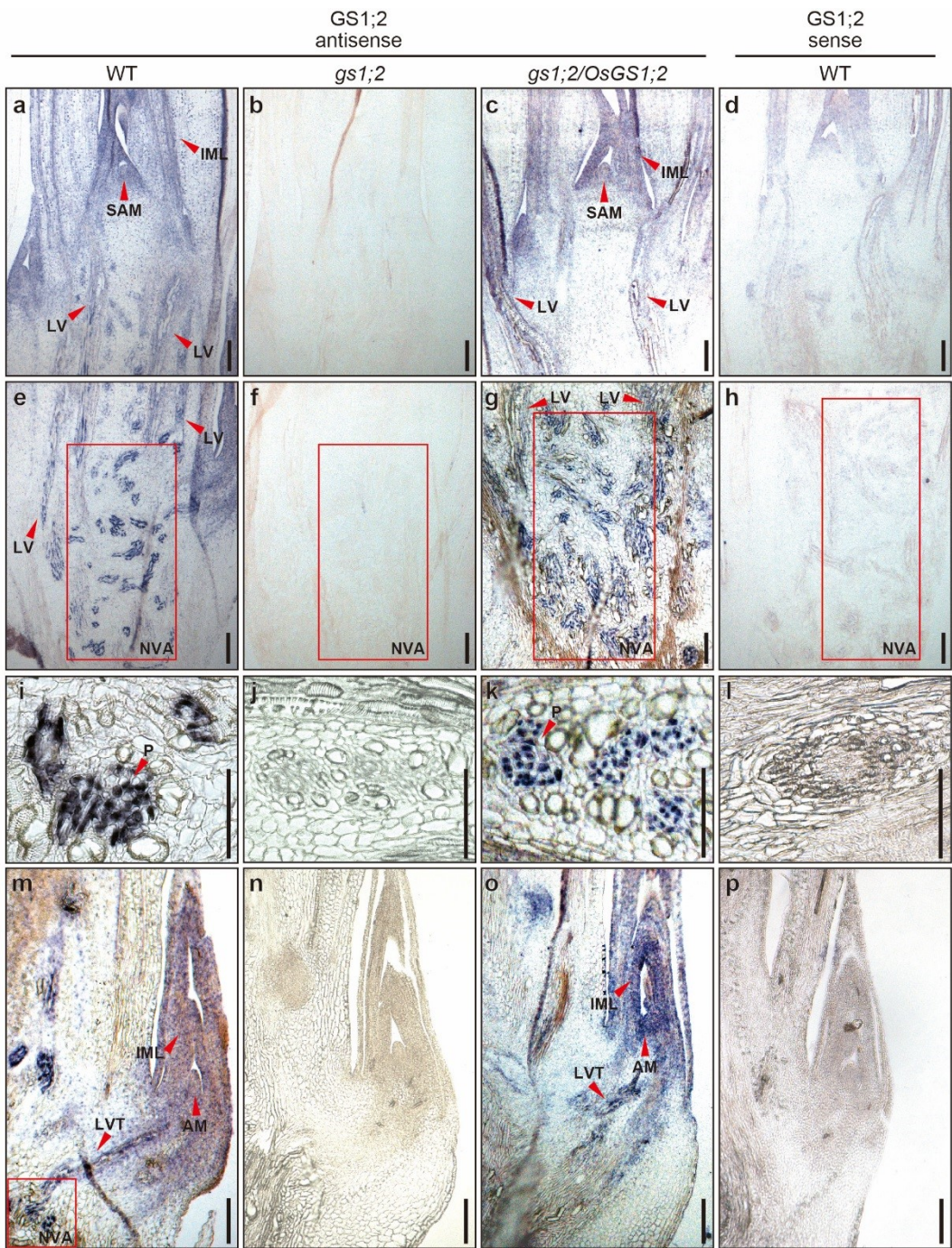


Figure 8. *In situ* localization of *OsGS1;2* mRNA in shoot basal parts prepared from wild-type rice (WT) (a, e, i, m), the *GS1;2* knockout mutant (*gs1;2*) (b, f, j, n), and the *gs1;2/OsGS1;2* complementation line (c, g, k, o) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to the WT sections (d, h, l, p) as a negative control. Red arrowheads indicate the shoot apical meristem (SAM) (a, c) and immature leaf (IML) area (a, c, m, o), the internode containing nodal vascular anastomoses (NVA) (red square in e—h), phloem (P) (i, k), nodal large vascular bundles (LV) (a, c, e, g), the tiller containing the axillary bud meristem (AM) (m, o) and large vascular bundles of the tiller (LVT) (m, o) of the 3rd internode in the basal part prepared from rice plants. Scale bars = 100 μ m. ³³

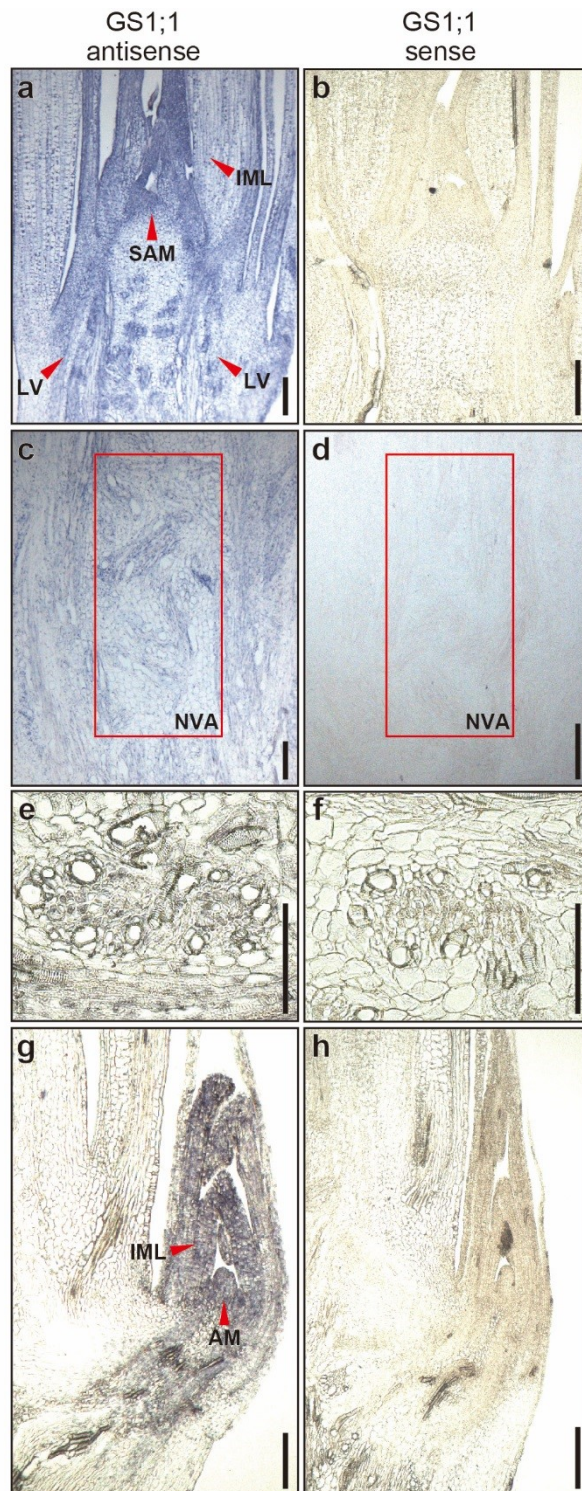


Figure 9. *In situ* localization of *OsGS1;1* mRNA in shoot basal parts prepared from wild-type rice (a, c, e, g) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to the WT sections (b, d, f, h) as a negative control. Red arrowheads indicate the shoot apical meristem (SAM) and large vascular bundles (LV) (a), the immature leaf (IML) containing-area (a, g), the internode containing nodal vascular anastomoses (NVA) (red square in c, d), and the tiller containing axillary bud meristem (AM) (g) of the 3rd internode in the basal part of rice plants. Scale bars = 100 μ m.

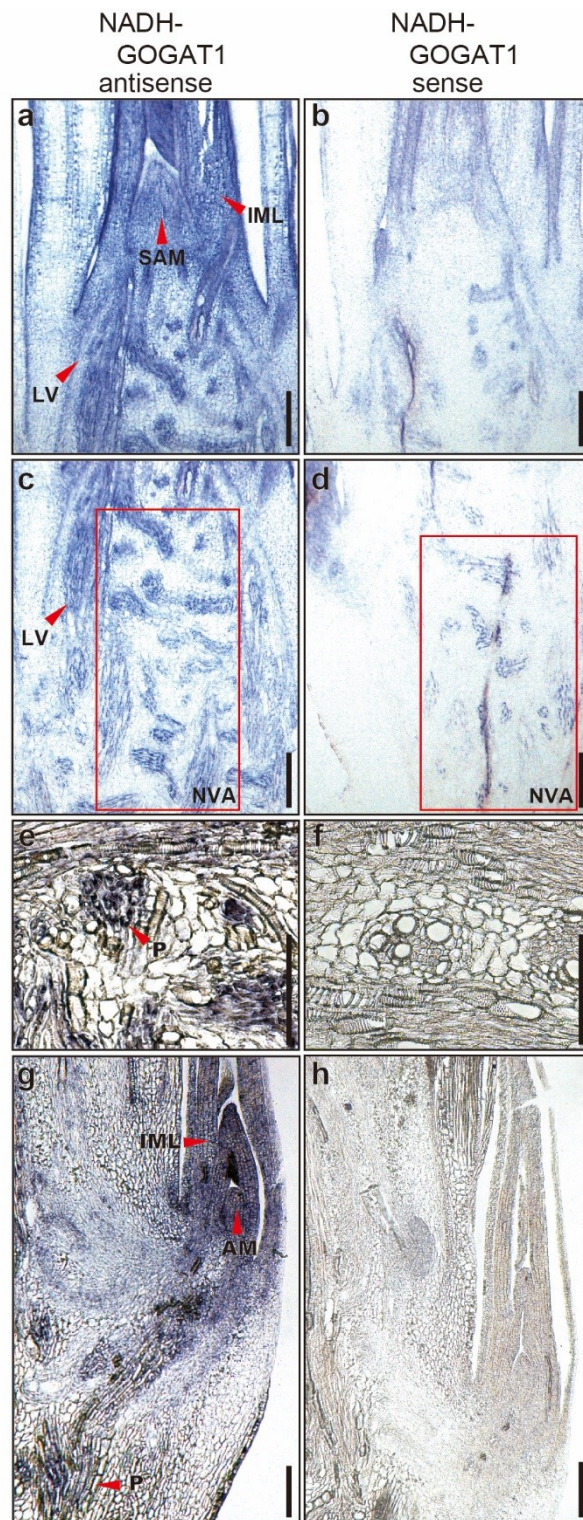


Figure 10. *In situ* localization of *OsNADH-GOGAT* mRNA in shoot basal parts prepared from wild-type rice (a, c, e, g) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to the WT sections (b, d, f, h) as a negative control. Red arrowheads indicate the shoot apical meristem (SAM) (a), the immature leaf (IML) containing-area (a, g), large vascular bundles (LV) (a, c), the internode containing nodal vascular anastomoses (NVA) (red square in c, d), phloem (p) (e, g) and the tiller containing axillary bud meristem (AM) (g) of the 3rd internode in the basal part of rice plants. Scale bars = 100 μ m.

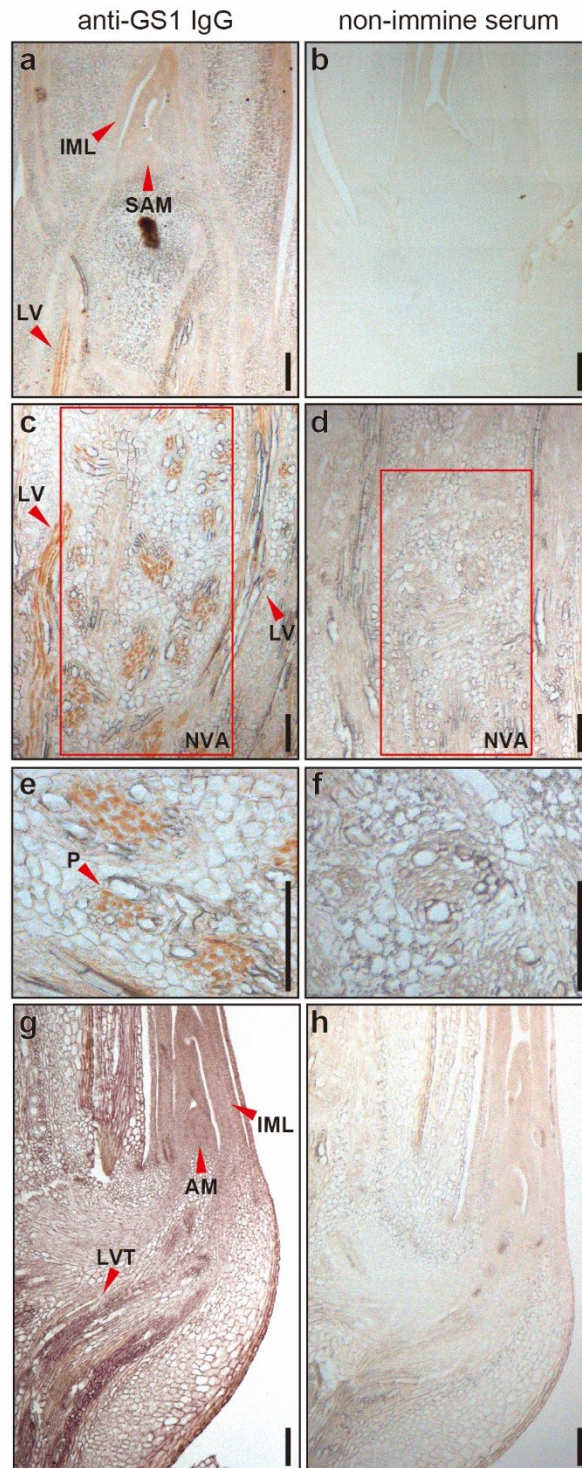


Figure 11. Immuno-detection of GS1 protein in shoot basal parts of wild-type rice at the 4th-leaf stage (a, c, e, g). Non-immune serum was used as a negative control (b, d, f, h). Red arrowheads indicate the shoot apical meristem (SAM) (a), the immature leaf (IML) containing-area (a, g), large vascular bundles (LV) (a, c), the internode containing nodal vascular anastomoses (NVA) (red square in c, d), phloem (p) (e), and the tiller containing axillary bud meristem (AM) (g) of the 3rd internode in the basal part of rice plants. Scale bars = 100 μ m.

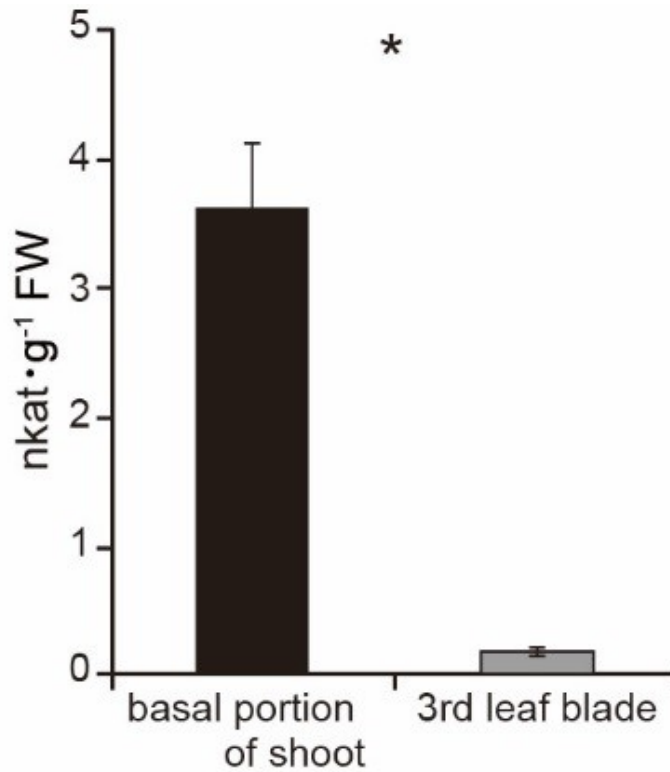


Figure 12. Comparison of phenylalanine ammonia-lyase activity between the shoot basal part (black column) and the 3rd leaf blade (gray column) prepared from wild-type rice seedlings at the 4th-leaf stage. Rice seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl until the 4th-leaf stage. Mean values plus the SE of five independent plants are indicated. An asterisk denotes statistically significant differences between tissues (* $P < 0.05$ by Student's t -test).

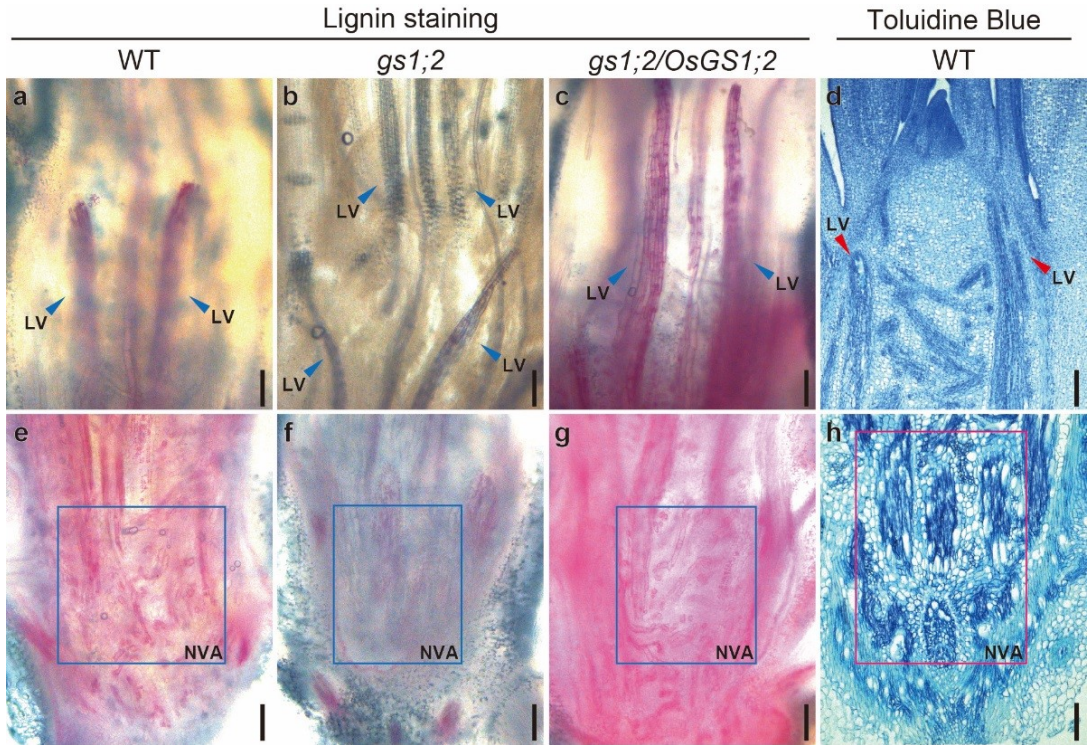


Figure 15. Detection of lignin deposition in the shoot basal part of rice. Longitudinal sections containing shoot apical meristem and immature leaf (a—d), and the 3rd internode containing nodal vascular anastomoses (NVA) (blue or red square in e—h) and nodal large vascular bundles (LV) (a—d) were prepared from wild-type rice (WT), the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*), and the *gs1;2/OsGS1;2* complementation line at the 4th-leaf stage. The structure of tissues was visualized by staining with toluidine blue O (d, h). Scale bars = 100 μ m.

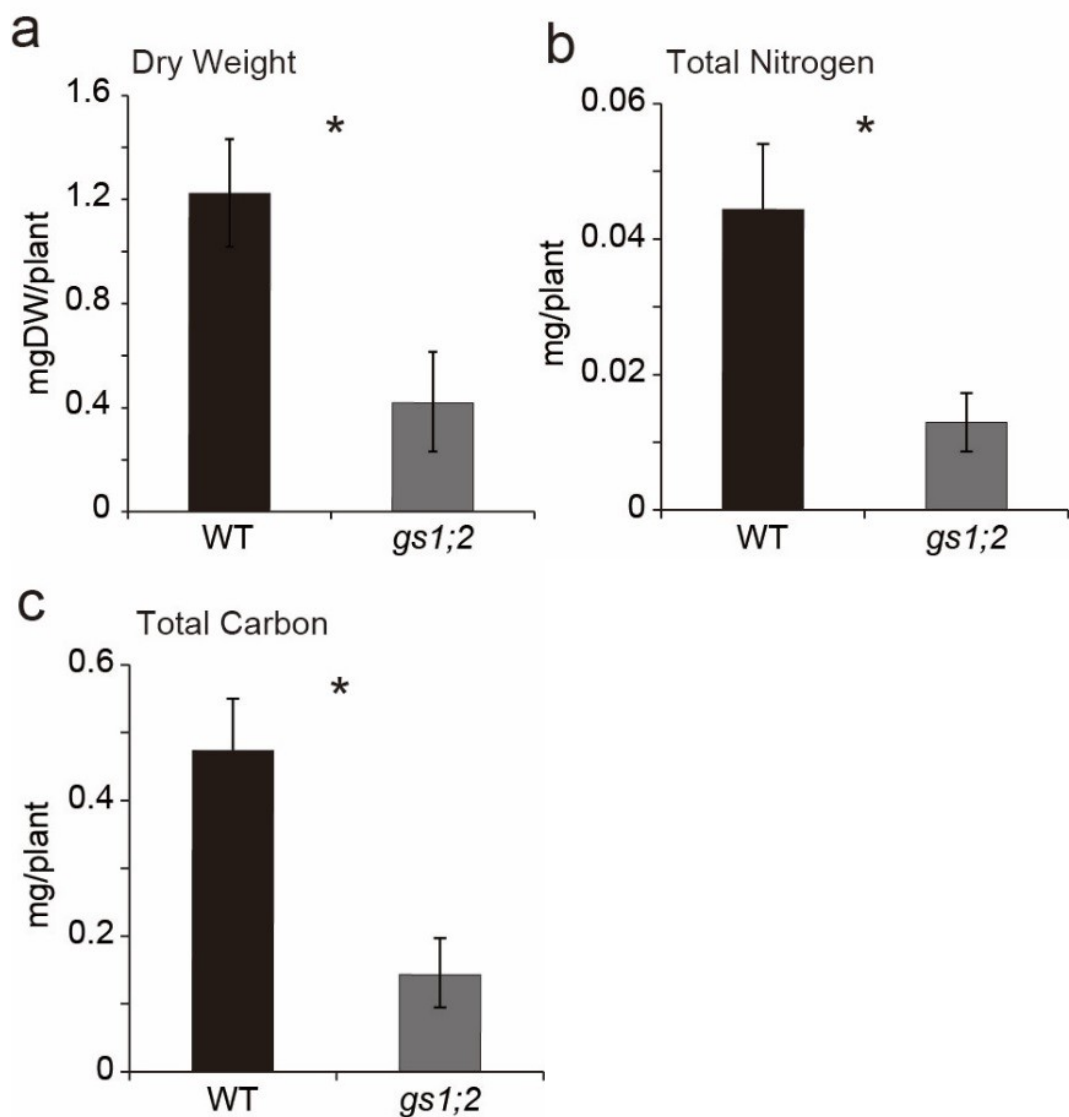


Figure 16. Dry weight (a), and contents of total nitrogen (b) and total carbon (c) in the shoot basal parts of wild-type rice (WT) (black columns) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (gray columns) at the 4th-leaf stage. Rice plants were grown in the presence of 1 mM NH_4^+ . Mean values plus the SD of five independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between the WT and *gs1;2* (* $P < 0.05$ by Student's *t*-test).

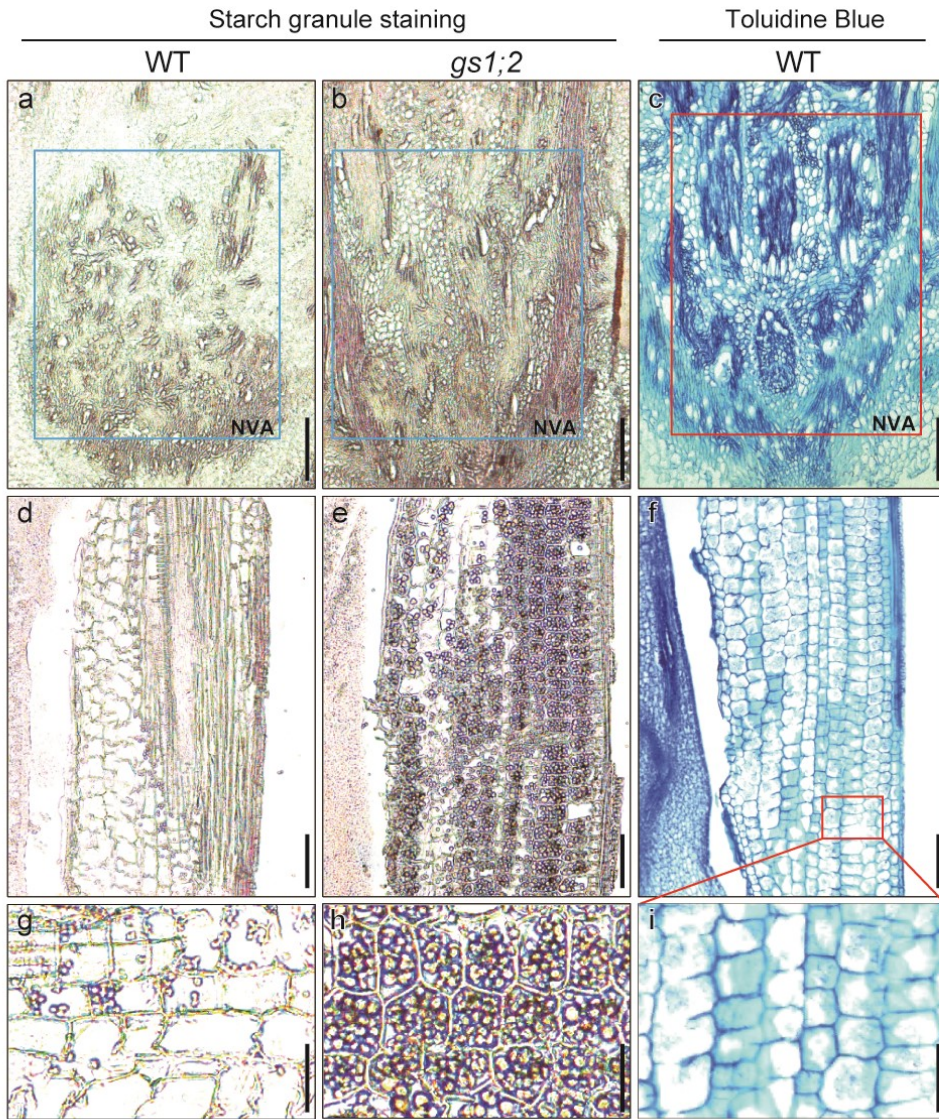


Figure 15. Detection of starch granule deposition in the shoot basal parts of wild-type rice (WT) (a, d, g) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (b, e, h) at the 4th-leaf stage. Longitudinal sections of the shoot basal parts containing nodal vascular anastomoses of the internode (NVA) (blue or red square in a—c) and the leaf sheath (d—i) were prepared. Scale bars = 100 μm (a—f) and 50 μm (g—i). The structure of tissues was visualized by staining with toluidine blue O (c, f, i).

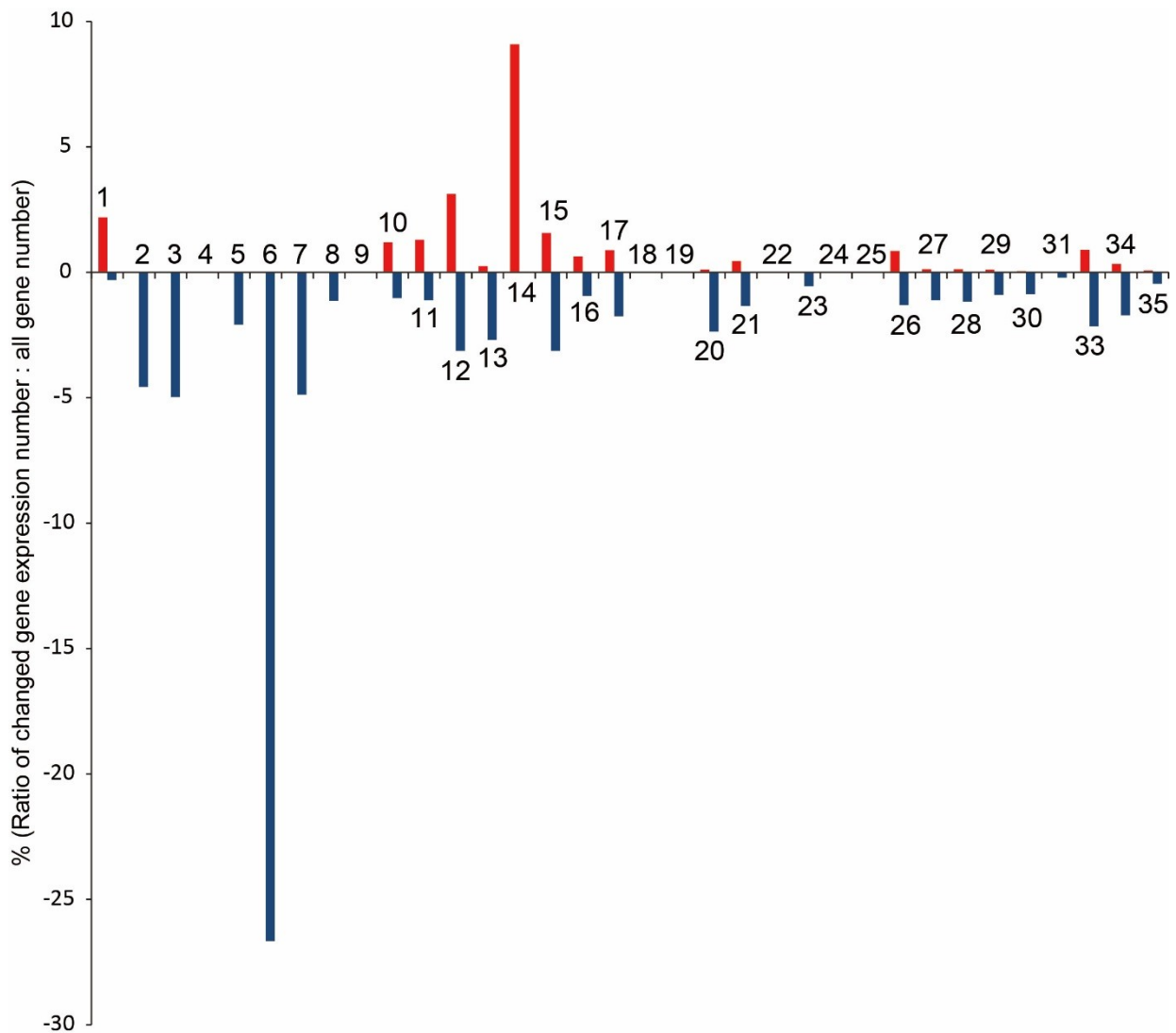


Figure 16. Functional categories of 578 genes in the shoot basal part of the GS1;2 mutant at the 4th-leaf stage. The selected 578 genes were classified into 34 kinds of functional categories of genes (BINs) by MapMan software. The ratio for each category of gene function (BIN) on Y-axis was calculated by the formula shown below.

Ratio = gene number classified into each category among the selected 578 genes /gene number classified into each category among all of annotated 60,055 genes.

1, Photosystem; 2, Major sugar metabolism; 3, Minor sugar metabolism; 4 ,Glycolysis; 5, Fermentation; 6, Glyoxylate cycle; 7, Pentose phosphate pathway; 8, Tricarboxylic acid cycle; 9, Mitochondria electron transport chain; 10, Cell wall; 11, Lipid metabolism; 12, Nitrogen assimilation; 13, Amino acid metabolism; 14, Sulfur assimilation; 15, Metal handling; 16, Secondary metabolism; 17, Hormone metabolism; 18, Co-factor and vitamin metabolism; 19, Tetrapyrrole synthesis; 20, Stress; 21, Redox; 22, Polyamine; 23, Nucleotide metabolism; 24, Biodegradation of xenobiotics; 25, C1 metabolism; 26, Miscellaneous genes; 27, RNA; 28, DNA; 29, Protein; 30, Signaling; 31, Cell; 33, Development; 34, Transport; 35, Not assigned. There was no gene classified into the 32 and 36 BINs.

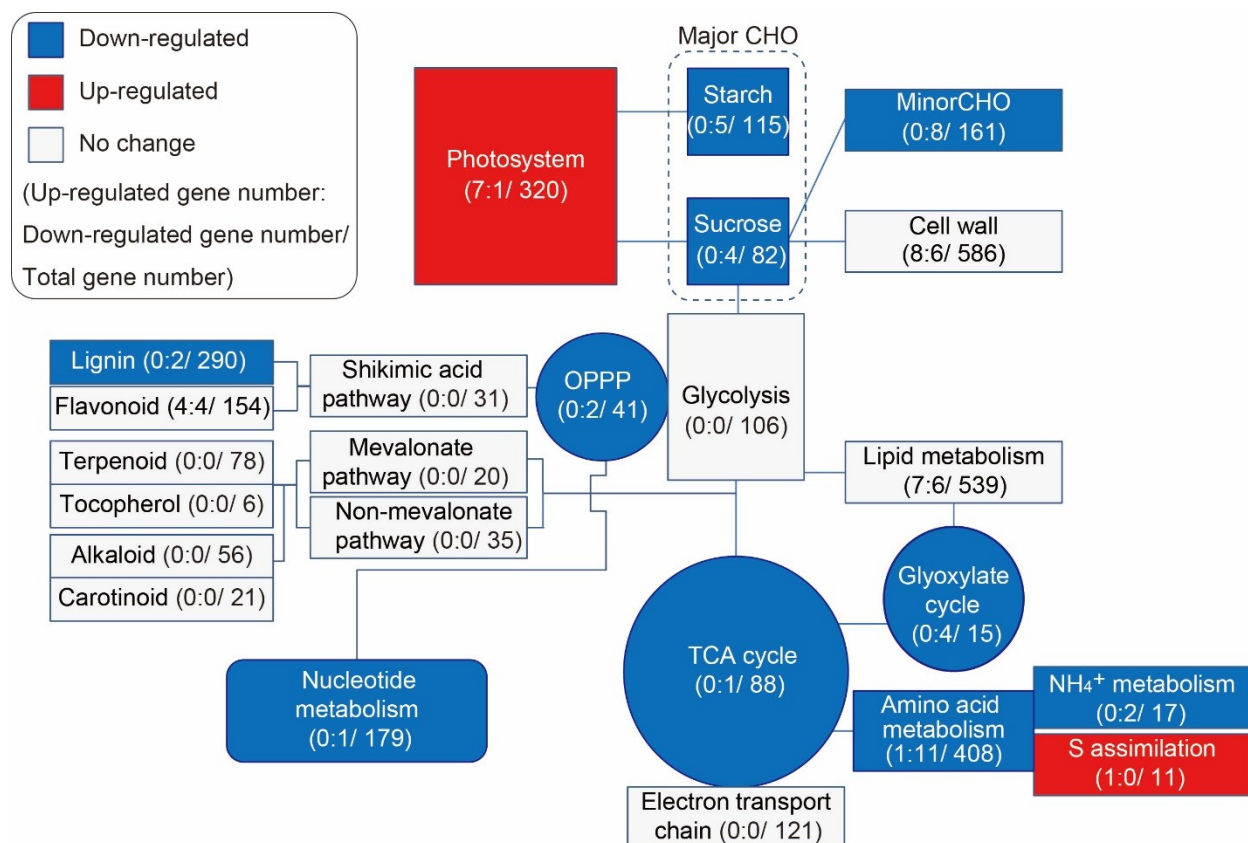


Figure 17. Changes in expression of genes related to metabolisms in the shoot basal part of the GS1;2 knockout mutant. The metabolic pathway described by the “Overview” program of the MapMan software was used with slight modification. The number of up-regulated genes is indicated on the left in parentheses, while the number of down-regulated genes is indicated on the right, below the functional category name (BIN). The red boxes indicate genes that are up-regulated more than twofold, while the blue boxes indicate genes that are down-regulated more than twofold. CHO, sugar metabolism; OPPP, oxidative pentose phosphate pathway; S, sulfur; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle.

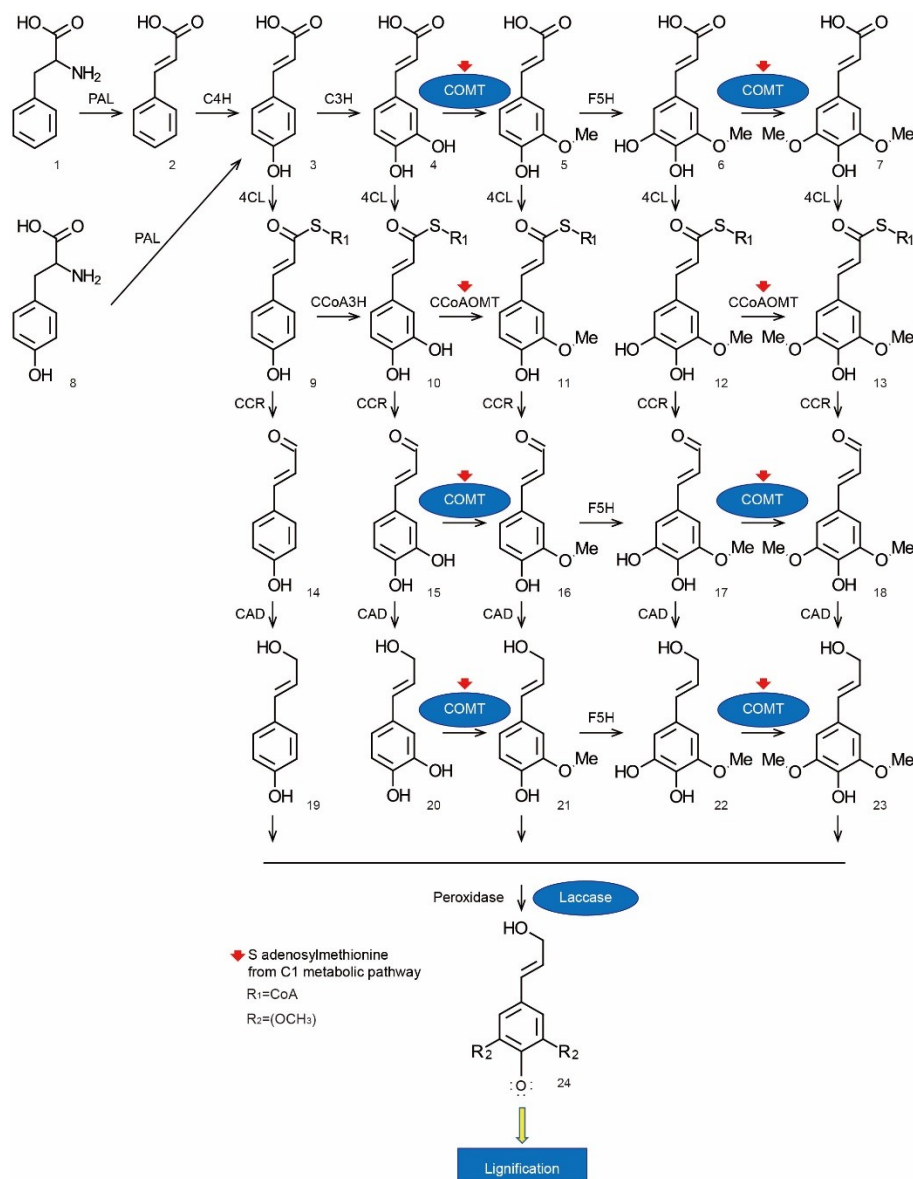


Figure 18. Down-regulation of genes related to the secondary metabolism in the shoot basal part of the GS1;2 knockout mutant. The secondary metabolism pathway described by the MapMan software was slightly modified according to the previous research (Guo et al., 2001). The red arrow shows S-adenosylmethionine produced by the C1 metabolic pathway used as a substrate for COMT and CCoAOMT. 4CL, 4-coumarate-CoA ligase; C3H, cinnamate 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, coniferyl-alcohol dehydrogenase; CCoA3H, caffeoyl-CoA 3-hydroxylase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA O- methyltransferase; CCR, cinnamoyl-CoA reductase; COMT, caffeic acid 3-O-methyltransferase; F5H, flavonoid-5-hydroxylase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase. 1, phenylalanine; 2, cinnamate; 3, 4-coumarate; 4, caffeate; 5, ferulate; 6, 5-hydroxyferulate; 7, sinapate; 8, tyrosine; 9, 4-coumaroyl-CoA; 10, caffeoyl-CoA; 11, feruloyl-CoA; 12, 5-hydroxyferuloyl-CoA; 13, sinapoyl-CoA; 14, 4-coumaraldehyde; 15, caffeoyl aldehyde; 16, coniferaldehyde; 17, 5-hydroxyconiferaldehyde; 18, sinapaldehyde; 19, 4-coumaric alcohol; 20, caffeoyl alcohol; 21, coniferyl alcohol; 22, 5-hydroxyconiferyl alcohol; 23, sinapyl alcohol; 24, 4-coumaric alcohol radical, coniferyl alcohol radical and sinapyl alcohol radical. Note that gene expression of *COMT* and *Laccase*, that are associated with lignin synthesis, were down-regulated.

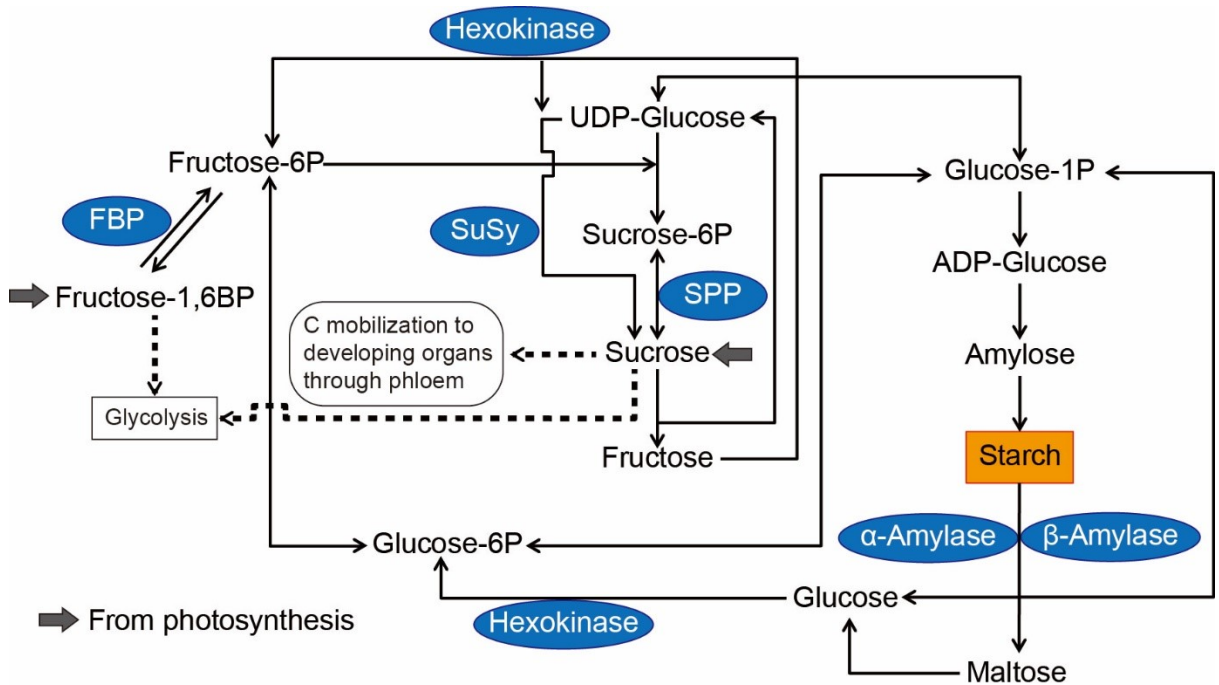


Figure 19. Changes in gene expression related to sugar metabolisms in the shoot basal part of the GS1;2 knockout mutant. The sugar metabolism pathway described by the MapMan software was slightly modified according to the previous research (Izawa et al., 2011). The dark gray arrow shows inflow of substrates from photosynthesis and the arrow with the dotted line shows outflow of substrates to glycolysis. The blue ovals indicate down-regulated genes and the orange box indicates a increased substrate (starch). FBP, fructose 1,6-bisphosphatase; P, phosphate; SPP, sucrose-phosphatase; SuSy, sucrose synthase.

3rd leaf stage

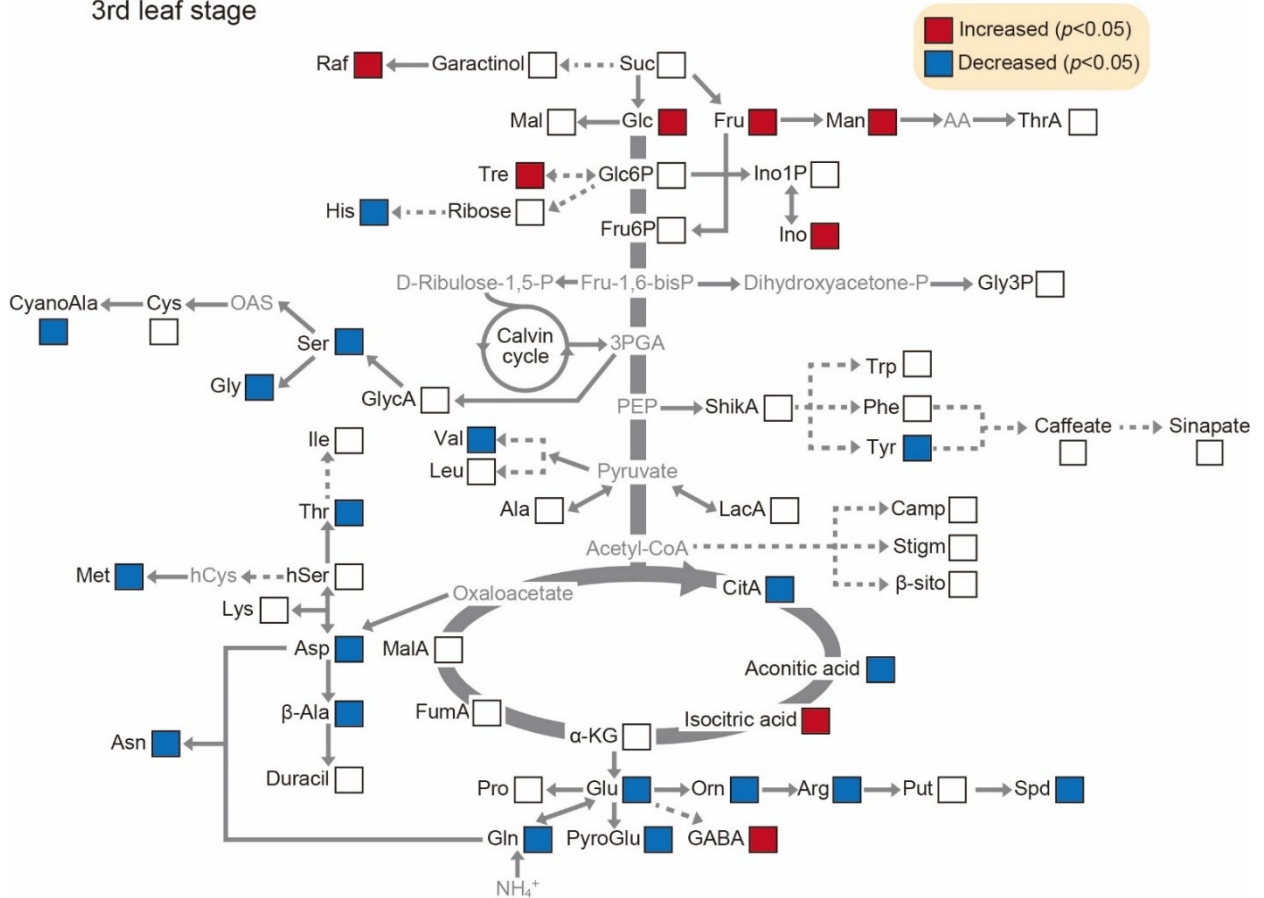


Figure 20. Changes in contents of metabolites in the basal part of the GS1;2 knockout mutant at the 3rd-leaf stage. Increased metabolites were indicated as red boxes, while decreased metabolites were indicated as blue boxes. Ala, alanine; β-Ala, β-alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartic acid; Camp, campesterol; CitA, citric acid; CyanoAla, 3-cyano alanine; Cys, cysteine; Fru, fructose; Fru6P, fructose 6 -phosphate; FumA, fumaric Acid; GABA, 4-aminobutanoic acid; Glc, glucose; Glc6P, glucose 6-phosphate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; Gly, glycine; GlycA, glycolic acid; Gly3P, glycerol-3-phosphate; His, histidine; hSer, homoserine; Ile, isoleucine; Ino, inositol; Ino1P, inositol; α-KG, α-ketoglutaric acid; LacA, lactic acid; Leu, leusine; Lys, lysine; Mal, maltose; MalA, malic acid; Man, mannose; Met, methionine; Orn, ornithine; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Put, putrescine; PyroGlu, pyroglutamate; Raf, raffinose; Suc, sucrose; Ser, serine; ShikA, shikimic acid; β-sito, β-sitosterol; Spd, spermidine; Stigm, stigmasterol; Thr, threonine; ThrA, threonic acid; Tre, trehalose; Trp, tryptophan; Tyr, tyrosine; Val, valine.

4th leaf stage

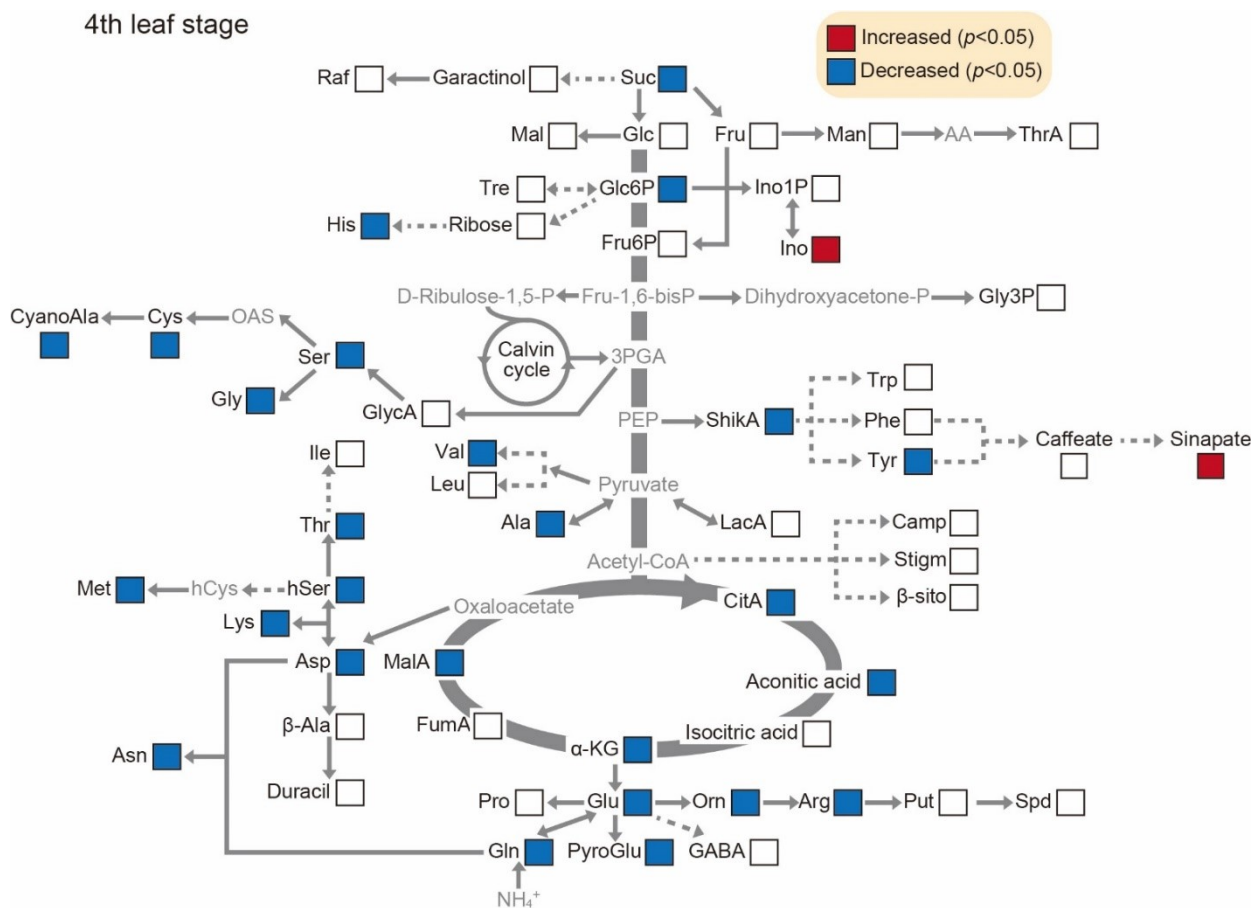


Figure 21. Changes in contents of metabolites in the basal part of the GS1;2 knockout mutant at the 4th-leaf stage. Increased metabolites were indicated as red boxes, while decreased metabolites were indicated as blue boxes. Each abbreviation is the same as in Fig. 20.

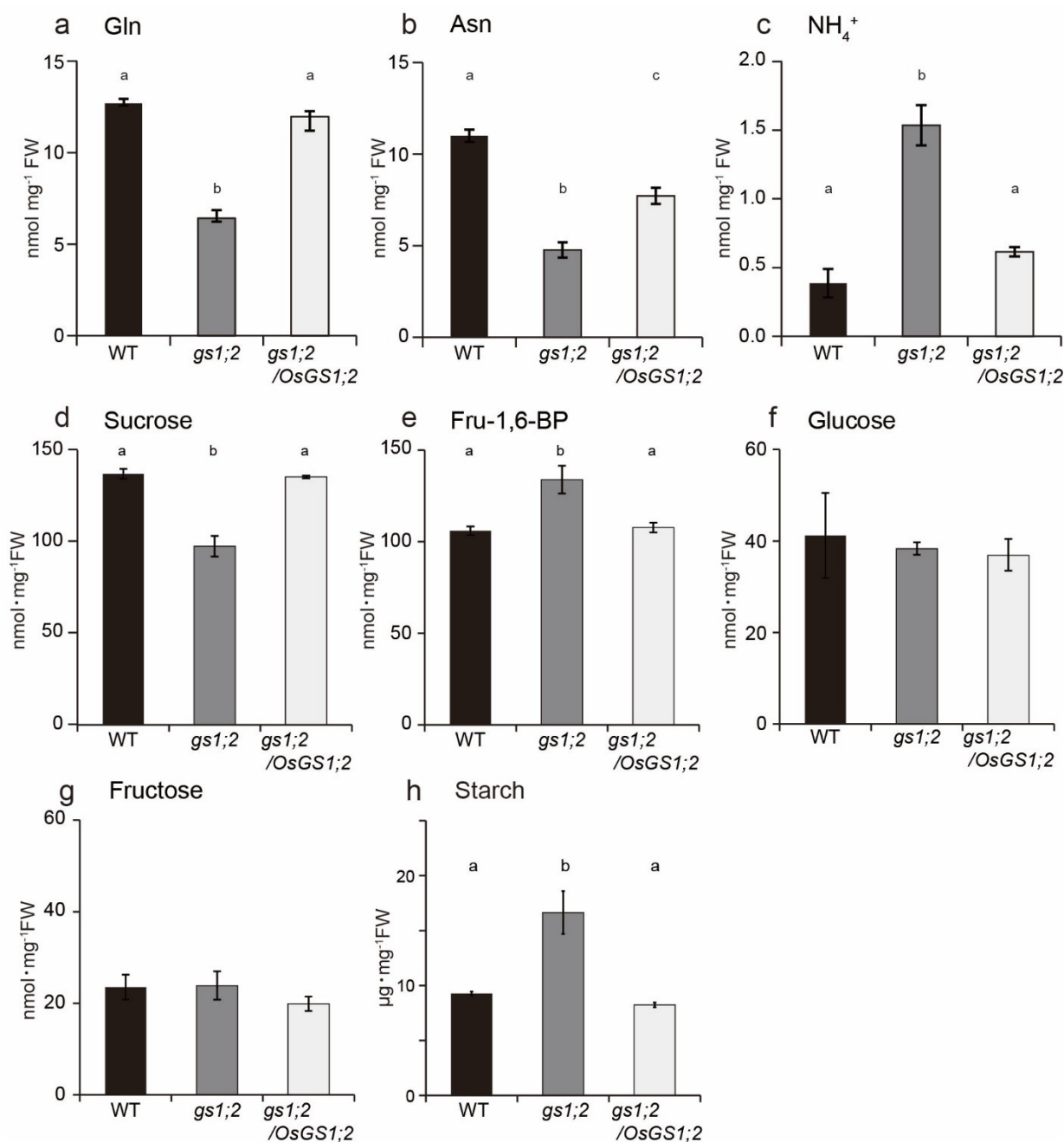


Figure 22. Changes in contents of Gln (a), Asn (b), NH₄⁺ (c), sucrose (d), fructose 1,6-bisphosphate (Fru-1,6-BP) (e), glucose (f), fructose (g), and starch (h) in the basal parts of wild-type rice (WT), the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) and the *gs1;2/OsGS1;2* complementation line (*gs1;2/OsGS1;2*) at the 4th-leaf stage. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. Mean values plus the SD of five independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences in contents of each metabolites between the WT, *gs1;2* and *gs1;2/OsGS1;2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

Table 1. Candidates of causative 578 genes for cessation of axillary buds-elongation in the GS1;2 knockout mutant. These genes were obtained by transcriptomic analyses and were classified into 34 categories.

Function category	Affymetrix ID	TIGR code	RAP-DB code	Gene name	FC
Photosynthesis	os.10671.1.s1_at	Loc_os01g64960	Os01g069800	Photosystem II 22 kDa protein	2.81
	os.175.1.s1_at	Loc_os04g59440	Os04g069080		2.77
	os.12393.2.s1_s_at	Loc_os08g01380	Os08g0104600	Ferredoxin-1, chloroplast precursor	2.21
	os.8514.1.s1_at	Loc_os02g52650	Os02g0764500	Chlorophyll a-b binding protein 4	1.82
	os.52588.1.s1_at	Loc_os07g30670	Os07g0489800	Electron carrier/ electron transporter/ iron ion binding protein	-3.47
	os.28203.1.s1_a_at	Loc_os04g38600	Os04g0459500	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	2.26
	os.11756.1.s1_s_at	Loc_os03g16050	Os03g0267300	Cp Fructose-1,6-bisphosphatase	2.23
Major CHO metabolism	os.10959.1.s1_at	Loc_os12g19470	Os12g0292400	Ribulose biphosphate carboxylase small chain C	2.03
	os.25619.1.s1_at	Loc_os05g36270	Os05g0438600	Cyto Fructose-1,6-bisphosphatase	-1.56
	os.49091.1.s1_at	Loc_os05g05270	Os05g0144900	Sucrose-phosphatase	-1.74
	os.17890.1.s1_at	Loc_os03g22120	Os03g0340500	Sucrose synthase 2	-2.20
	os.6114.1.s1_at	Loc_os05g09500	Os05g0187100	Hexokinase 1	-3.49
	Os.46627.1.S1_at	Loc_os10g40650	Os10g0555100	Glycosyl transferase 8 domain containing protein	-2.18
	os.28098.1.s1_at	Loc_os10g32810	Os10g0465700	Beta-amylase	-1.86
Minor CHO metabolism	os.13708.2.a1_at	Loc_os03g22790	Os03g0351300		-1.96
	os.46618.1.s1_at	Loc_os10g41550	Os10g0565200		-3.34
	os.10908.1.s1_a_at	Loc_os08g36910	Os08g0473900	Alpha-amylase	-5.16
	os.2677.1.s1_at	Loc_os07g48830	Os07g0687900	Galactinol synthase 3	-2.71
	os.27290.1.a1_at	Loc_os06g07600	Os06g0172800	Alkaline alpha galactosidase 2	-2.17
	os.21893.3.a1_at	Loc_os05g06160	-	Trehalose-6-phosphate synthase	-1.77
	os.21893.3.a1_at	Loc_os08g31980	Os08g0414700		-1.77
Fermentation	os.6139.1.s1_at	Loc_os08g34580	Os08g0445700		-1.92
	os.12391.1.s1_a_at	Loc_os02g54820	Os02g0790500	Inositol oxygenase	-2.10
	os.6345.1.s1_at	Loc_os06g36560	Os06g0561000	ARA1	-3.83
	os.18948.1.s1_at	Loc_os02g04840	Os02g0141300	Aldehyde dehydrogenase	-2.00
	os.313.1.s1_a_at	Loc_os02g49720	Os02g0730000	Pyruvate, phosphate dikinase	-2.45
	os.7144.2.s1_a_at	Loc_os05g33570	Os05g0405000	Transferase, transferring glycosyl groups	-1.73
	os.12528.1.s1_x_at	Loc_os03g31750	Os03g0432100		-1.75
Glyoxylate cycle	os.8756.2.a1_at	Loc_os07g46380	Os07g0657400	Glycosyltransferase	-1.54
	os.46627.1.s1_at	Loc_os10g40640	Os10g0555100	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-2.18
	os.51848.1.s1_x_at	Loc_os06g46372	Os06g0677400		-1.68
	os.6393.1.s1_at	Loc_os07g41280	Os07g0604000	6-phosphogluconolactonase	-2.09
	os.19003.1.s1_a_at	Loc_os01g03140	Os01g0314100	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	-2.43
	os.37902.1.s1_at	Loc_os03g30250	Os03g0416300	COBRA-like protein 4	2.41
	os.37902.1.s1_at	Loc_os03g30260	Os03g0416400	Phytochelatin synthetase-like conserved region family protein	2.41
Cell wall	os.37820.1.s1_x_at	Loc_os10g05970	Os10g0150400	Proline-rich protein	1.70
	Os.14139.1.S1_at	Loc_os04g31340	Os04g0382300	SNF1-related Protein Kinase regulatory subunit Gamma 1	-2.27
	os.56145.1.s1_at	Loc_os12g13890	Os12g0242100	Glycine-rich cell wall structural protein 2	-3.80
	os.54770.1.s1_at	Loc_os02g03120	Os02g0123700	Endoglucanase 1	2.07
	os.17509.1.s1_at	Loc_os02g50490	Os02g0738600	Endoglucanase 2	1.97
	os.2075.1.s1_at	Loc_os01g19220	Os01g0296700	Beta-D-xylosidase	1.75
	os.37718.1.s1_at	Loc_os10g26940	Os10g0409400	Polygalacturonase-1 non-catalytic beta subunit	-2.01
Lipid metabolism	os.18421.1.s1_a_at	Loc_os03g01800	Os03g0108300	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 32	2.12
	os.affx.4907.1.s1_x_at	Loc_os06g22919	Os06g0335900	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 21	-1.80
	os.21349.1.s1_at	Loc_os03g04020	Os03g0132200	Expansin-like 3	-2.49
	os.53938.1.s1_at	Loc_os05g29790	Os05g0361500	Papillar cell-specific pectin methyltransferase-like protein	-2.25
	os.9534.1.s1_at	Loc_os01g65830	Os01g0880800	Acyl-desaturase	1.59
	os.9153.1.s1_at	Loc_os02g02700	Os02g0119200	AMP binding protein	-1.54
	os.49265.1.s2_a_at	Loc_os03g61720	Os03g0832800	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	2.17
Nitrogen metabolism	os.17921.1.s1_at	Loc_os05g47540	Os05g0548900	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	1.82
	os.21044.1.s1_at	Loc_os07g29220	Os07g0474600	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase/ oxidoreductase	1.50
	os.27712.1.s1_at	Loc_os06g48510	Os06g0698785	Choline monooxygenase	-2.69
	Os.52185.1.A1_at	Loc_os04g35790	Os04g0438600	Glycolipid binding / glycolipid transporter	-2.05
	os.50805.1.s1_at	Loc_os08g20130	Os08g0297800	Flavonol 3-sulfotransferase	2.31
	OsAffx.3755.1.S1_at	-	Os04g0174900	Acyl-protein thioesterase 2	2.35
	os.8413.2.a1_at	Loc_os04g28520	Os04g0353600	Fatty acyl coA reductase	1.63
Lipid degradation	os.51042.1.s1_at	Loc_os11g01040	Os11g0100600	Monoglyceride lipase	-1.67
	os.12993.1.s1_at	Loc_os05g07090	Os05g0163700	Glutaryl-CoA dehydrogenase	-1.80
	os.7513.1.s1_at	Loc_os11g39220	Os11g0605500	Acyl-coenzyme A oxidase 1	-3.18
	os.4717.1.s1_at	Loc_os08g36480	Os08g0468100	Nitrate reductase	3.83
	os.4717.1.s1_at	Loc_os08g36500	Os08g0468700		3.83
	os.12728.1.s1_at	Loc_os03g12290	Os03g0223400	Glutamine synthetase 1;2	-2.97
	os.52150.1.s1_x_at	Loc_os04g45970	Os04g0543900	Glutamate dehydrogenase 2	-3.21
Sulfur metabolism	os.19519.1.s1_s_at	Loc_os07g32570	-	Adenosine 5'-phosphosulfate reductase	6.94
	os.28110.1.s1_x_at	Loc_os04g55710	Os04g0650700	Asparaginase 2	4.14
	os.57351.1.s1_at	-	Os01g0720700	Serine acetyltransferase	-1.89
	os.11327.1.s1_at	Loc_os03g18130	Os03g0291500	Asparagine synthetase 1	-2.17
	os.38599.3.s1_a_at	Loc_os05g03480	Os05g0125500	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	-1.58
	os.38599.3.s1_a_at	Loc_os05g03460	-	Protein kinase APK1B	-1.58
	os.11982.1.s1_at	Loc_os07g07470	Os07g0170100	3-methyl-2-oxobutanate dehydrogenase	-1.60
Amino acid metabolism	os.28409.20.a1_a_at	Loc_os05g03480	Os05g0125500	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	-1.83
	os.19587.1.s1_at	Loc_os05g07940	-	Lactoylglutathione lyase	-2.06
	os.54948.1.s1_at	Loc_os02g28110	Os02g0482400	Ornithine decarboxylase	-2.20
	os.13781.1.s2_at	Loc_os02g54254	Os02g0783700	Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase	-2.21
	os.34624.1.s1_at	Loc_os03g38540	Os03g0582000	Glutamate formiminotransferase	-2.48
	os.17909.1.s1_a_at	Loc_os12g08260	Os12g0183100	Pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit	-2.69
	os.18640.1.s1_at	Loc_os09g20000	Os09g0364800	Metal ion binding protein	1.67
Metal handling	os.38381.1.s1_at	Loc_os01g20830	Os01g0309800	Heavy metal-associated domain containing protein	-1.58
	os.12096.4.s1_s_at	-	Os11g0106700	ATFER4 (ferritin 4)	-2.62
	os.26569.1.s1_at	Loc_os04g09604	Os04g0175600	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	-2.65
	os.14830.1.s1_a_at	Loc_os01g63190	Os01g0850700	Laccase	-2.59
	os.6354.1.s1_at	Loc_os11g02440	Os11g0116300	Chalcone-flavonone isomerase	2.75
	os.6354.1.s1_at	Loc_os12g02370	Os12g0115700		2.75
	os.32454.1.s1_at	Loc_os01g01650	Os01g0106300	Isoflavone reductase	2.19
Secondary metabolism	os.1000.1.s1_at	Loc_os01g01660	Os01g0106400	Isoflavone reductase	2.03
	os.12021.1.s1_at	Loc_os12g16290	-		-1.62
	os.6207.1.s1_s_at	Loc_os06g41840	Os06g0623600	Dihydroflavonol-4-reductase	-1.81
	os.17014.1.s1_at	Loc_os04g53850	Os04g0630800	Leucoanthocyanidin reductase	-2.28
	os.6542.1.s1_at	Loc_os03g08624	Os03g0184550	Dihydroflavonol-4-reductase	-3.11

Table 1.

	Function category	Affymetrix ID	TIGR code	RAP-DB code	Gene name	FC	
Hormone metabolism	ABA.	os.50222.1.s1_at	Loc_os12g24800	Os12g0435200	Carotenoid cleavage dioxygenase 1	1.81	
		os.37330.1.s1_at	Loc_os01g58860	Os01g0802700	Auxin efflux carrier component 5	1.94	
		os.23256.1.s1_at	Loc_os02g56120	Os02g0805100	OslAA9 - Auxin-responsive Aux/IAA gene family member	-1.57	
		osaffx.30169.1.s1_at	Loc_os09g37430	Os09g0546300	OsSAUR48 - Auxin-responsive SAUR gene family member	-1.70	
	Auxin.	osaffx.14380.1.s1_s_at	Loc_os04g52670	Os04g0617050	OsSAUR21 - Auxin-responsive SAUR gene family member	-2.17	
		os.23143.1.s1_at	Loc_os09g31478	Os09g0491740	Auxin hydrogen symporter	-2.43	
		os.37834.1.s1_a_at	Loc_os04g58280	Os04g0679400	Stem-specific protein TSJT1	-2.89	
		os.39652.1.s1_at	Loc_os09g37330	Os09g0545280	OsSAUR39 - Auxin-responsive SAUR gene family member	-3.71	
		os.53828.1.s1_at	Loc_os08g41720	Os08g0529000	Auxin efflux carrier component 4	-3.38	
		Cytokinin.	os.15908.1.s1_s_at	Loc_os01g72330	Os01g0952500	OsRR4 - Rice type-A response regulator	2.06
			os.37430.1.s1_at	Loc_os11g04720	Os01g0143300	OsRR9 - Rice type-A response regulator	2.72
		Ethylene.	osaffx.21616.1.s1_s_at	Loc_os01g54890	-	Ethylene-responsive transcription factor 2	-1.58
	Gibberelin.	os.21103.1.s1_x_at	Loc_os03g42130	Os03g0618300	Gibberellin 20 oxidase	2.03	
		os.22197.1.s1_at	Loc_os06g20200	Os06g0306600	Gibberellin receptor GID1L2	-2.12	
		os.31778.2.s1_x_at	Loc_os01g61610	Os01g0832600	Gibberellin 20 oxidase	-3.76	
		Jasmonate.	os.18598.1.s1_at	Loc_os03g49260	Os03g0699700	Lipoxygenase 1	-2.26
	Stress	Salicylic acid.	osaffx.15406.1.s1_at	Loc_os06g13350	Os06g0241400	Benzoate carboxyl methyltransferase	1.63
			os.17356.1.a1_a_at	Loc_os11g15040	Os11g0256900		-1.64
		osaffx.16709.2.s1_s_at	Loc_os07g44280	Os07g0636800	Disease resistance response protein 206	2.16	
		os.11604.2.s1_at	Loc_os10g42190	Os10g0572300	Protein lgp4	-1.56	
os.27620.3.s1_at		Loc_os11g11550	Os11g0222900	LZ-NBS-LRR class	-1.56		
os.42812.1.a1_at		Loc_os07g42520	Os07g0617100	Dirigent-like protein pDIR12	-1.68		
os.12129.1.s1_a_at		Loc_os02g57280	Os02g0818000	Brown planthopper-induced resistance protein 1	-1.70		
os.39087.1.s1_at		Loc_os01g14550	Os01g0248300	Pathogen-related protein	-1.72		
os.34061.1.s1_at		Loc_os06g17950	Os06g0287500	Disease resistance RPP13-like protein 3	-1.79		
os.49819.1.s1_at		Loc_os11g36200	Os11g0570000	Receptor kinase-like protein	-1.80		
os.11187.1.s1_at		Loc_os08g16120	Os08g0261000	Disease resistance protein RPM1	-1.80		
os.27875.1.s1_at		Loc_os10g28120	Os10g0416800	Chitinase 1	-1.81		
os.170.1.s1_at		Loc_os01g64110	Os01g0860500	Protein hevamine-A	-1.83		
Biotic		os.17058.1.s1_at	Loc_os06g47800	Os06g0693100	Disease resistance protein RGA3	-1.94	
		os.52240.1.s1_at	Loc_os11g39190	Os11g0605100	Protein resistance protein CAN_RGA1	-2.05	
		os.9347.1.s1_at	Loc_os11g47580	Os11g0701800	Xylanase inhibitor protein 1	-2.32	
		os.49578.1.s1_x_at	Loc_os11g47570	Os11g0701600	Xylanase inhibitor protein 2	-2.57	
		os.15247.1.s1_s_at	Loc_os12g39620	Os12g0586000	Disease resistance protein	-2.75	
		os.15247.1.s1_s_at	Loc_os12g39630	Os12g0586100	Serine/threonine-protein kinase SAPK9	-2.75	
		os.28531.1.s1_at	Loc_os01g64100	Os01g0860400	Acidic endochitinase	-2.87	
	osaffx.26676.1.s1_at	Loc_os05g01370	Os05g0104200	Polygalacturonase inhibitor	-2.88		
	os.50837.1.s1_at	Loc_os11g47560	Os11g0701500	Xylanase inhibitor protein 2	-3.18		
	os.4681.1.s1_at	Loc_os08g40690	Os08g0518900		-3.27		
Abiotic. Heat.	os.4670.1.s1_at	Loc_os11g47510	Os11g0701000	Xylanase inhibitor protein 1	-4.30		
	os.172.1.s1_a_at	Loc_os11g47500	Os11g0700900		-4.50		
	os.10636.2.a1_x_at	Loc_os06g06470	Os06g0159600	Heat shock protein ST1	-1.61		
	os.18397.1.s1_at	Loc_os02g46640	Os02g0693200	Chaperone protein dnaJ	-1.71		
	os.14380.1.s1_at	Loc_os02g44300	Os02g0661900	Structural molecule	-2.27		
	os.5615.1.s1_at	Loc_os03g18870	Os03g0300600	Chaperone protein dnaJ	-2.30		
	os.51752.2.s1_x_at	Loc_os05g07810	Os05g0170200	USP family protein	-3.29		
	os.35681.1.s1_at	Loc_os01g53220	Os01g0733200	Heat shock factor protein HSF30	-4.08		
	Abiotic. Touch/wounding.	osaffx.14412.2.s1_s_at	Loc_os04g54240	Os04g0635100	Wound induced protein	2.30	
		os.9489.1.s1_x_at	Loc_os08g26870	Os08g0357000	Wound responsive protein	-2.77	
		os.15428.1.s1_at	Loc_os01g50622	Os01g0702000	Wound inducive gene	-3.56	
		os.47732.1.s1_s_at	Loc_os12g36640	Os12g0552500	Fiber protein Fb20	-1.85	
	Abiotic. Unspecified.	os.26698.1.s1_a_at	Loc_os01g19820	Os01g0303800		-1.95	
		os.53572.1.s1_at	Loc_os07g47620	Os07g0673400	Universal stress protein	-2.04	
		os.26698.4.s1_s_at	Loc_os01g19820	Os01g0303800		-2.04	
		os.6812.1.s1_at	Loc_os10g21670	Os10g0361000	Dehydration stress-induced protein	-2.05	
		os.25124.1.a1_at	Loc_os12g36630	Os12g0552400	Fiber protein Fb19	-2.20	
		os.27293.2.s1_at	Loc_os07g36600	Os07g0551400	USP family protein	-2.35	
		os.12633.1.s1_at	Loc_os11g26790	Os11g0454300	Water stress-inducible protein Rab21	-2.40	
		os.8188.1.s1_s_at	Loc_os07g47620	Os07g0673400	Universal stress protein	-2.90	
os.5338.1.s1_at		Loc_os10g30150	Os10g0437500	Ethylene-responsive protein	-2.93		
os.22312.3.a1_a_at		Loc_os05g28740	Os05g0355400	Universal stress protein	-3.18		
Redox	Thioredoxin.	os.51130.1.s1_at	Loc_os05g40190	Os05g0480000	Thioredoxin H-type	1.51	
		os.11997.1.s1_at	Loc_os07g48510	Os07g0684100	Thioredoxin-like 1	-2.15	
		osaffx.3056.1.s1_at	-	os02g0774100	Thioredoxin	-2.91	
	Glutaredoxin.	os.55402.1.s1_at	Loc_os11g43520	Os11g0655900	OsGrx_C17 - glutaredoxin subgroup III	-2.45	
Nucleotide metabolism	Degradation.	os.23405.1.s1_at	Loc_os07g14150	Os07g0245100	Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein	-1.55	
		os.51337.1.s1_at	Loc_os06g39330	Os06g0593800	Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase	1.92	
		os.5606.1.s1_at	Loc_os07g37690	Os07g0564100	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase	-2.28	
		osaffx.4277.1.s1_s_at	Loc_os05g08750	Os05g0179900	Cold-induced glucosyl transferase	-2.34	
	Glucosyl.	os.32115.1.s1_at	Loc_os01g71350	Os01g0940800	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase GII	-2.34	
		os.49475.1.s1_at	Loc_os03g25790	Os03g0374600	Glycosyl hydrolases family 17 protein	-2.45	
		os.27755.1.s1_at	Loc_os07g35560	Os07g0539900	Hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	-2.56	
		os.51883.1.s1_at	Loc_os03g45390	Os03g0656800	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 5	-2.81	
		os.7947.1.s1_x_at	Loc_os05g31140	Os05g0375400	Lichenase-2 precursor	-3.20	
		os.6322.1.s1_at	Loc_os06g37560	Os06g0573600	Beta-galactosidase	-1.99	
Ethanolamine.	os.14121.1.s1_at	Loc_os11g06900	Os11g0170000	N-acylethanolamine amidohydrolase	2.03		
Misc	Glutathione S transferases.	os.25651.1.s1_at	Loc_os01g27360	Os01g0371200	Glutathione S-transferase GSTF1	1.65	
		osaffx.28293.1.s1_at	Loc_os07g05800	Os07g0152700	Lactoylglutathione lyase	-2.37	
		os.22485.1.a1_at	Loc_os11g29720	Os11g0487600	Cytochrome P450 78A4	3.12	
		os.18623.1.s1_at	Loc_os03g04530	Os03g0138200	Cytochrome P450 86A2	2.41	
	Cytochrome P450.	os.17180.1.s1_at	Loc_os08g43390	Os08g0547300	Cytochrome P450 78A3	-1.57	
		os.12129.1.s1_a_at	Loc_os02g57290	Os02g0819000	Cytochrome P450 97B3	-1.70	
		os.820.1.s1_s_at	Loc_os01g19020	Os01g0294700	Peroxidase 1	2.24	
		os.11556.1.s1_at	Loc_os07g48030	Os07g0677300	Peroxidase 2	2.23	
	Peroxidases.	os.10029.1.s1_at	Loc_os07g44550	Os07g0639000	Peroxidase 1	2.09	
		os.9893.1.s1_at	Loc_os03g13200	Os03g0234900	Peroxidase 53	1.83	
os.11549.1.s1_at		Loc_os12g02080	Os12g0112000	Peroxidase 52	1.65		
os.27793.1.s1_at		Loc_os02g14430	Os02g0240100	Peroxidase 68	-1.51		
os.11546.1.s1_at		Loc_os06g35520	Os06g0547400	Peroxidase 52	-2.50		
os.7938.1.s1_at		Loc_os04g59190	Os04g0688300	Peroxidase 2	-2.61		
os.159.1.s1_s_at		Loc_os03g13210	Os03g0235000	Peroxidase N	-3.85		
os.158.1.s1_at		Loc_os10g02070	Os10g0109600		-4.41		

Table 1.

	Function category	Affymetrix ID	TIGR code	RAP-DB code	Gene name	FC
Misc	Oxidases / oxygenase.	os.16891.1.s1_at	Loc_os03g05900	Os03g0153900	Monooxygenase	-1.68
		os.9293.1.s1_at	Loc_os04g40040	Os04g0476100	Copper methylamine oxidase precursor	-2.14
		os.50352.1.s1_at	Loc_os04g14690	Os04g0223500	Monooxygenase/ oxidoreductase	-3.49
	Phosphatases.	os.52870.1.s1_at	Loc_os11g34710	Os11g0549615	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	1.57
		osafix.20014.1.s1_at	Loc_os12g38770	Os12g0576750	Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	-2.00
		os.5147.1.s1_at	Loc_os03g49440	Os03g0701200	Phosphatase	-2.59
	Myrosinases-lectin-jacalin.	os.10027.1.s1_at	Loc_os04g03579	Os04g0125700	ATP binding protein	1.65
		os.49608.1.s1_at	Loc_os03g15340	Os03g0259100	Chemocyanin	2.23
		os.53242.1.s1_at	Loc_os02g52180	Os02g0758800	Uclacyanin-2 precursor	2.98
	Plastocyanin.	os.7743.1.s1_at	Loc_os06g11500	Os06g0218500	Minichromosome maintenance protein MCM	1.93
		os.7743.1.s1_at	Loc_os06g11490	Os06g0218600	Blue copper protein	1.93
		os.54869.1.s1_at	Loc_os06g47910	Os06g0694200	Alpha-L-fucosidase 2	2.16
	GDSL-motif lipase.	os.8555.1.s1_at	Loc_os05g06720	Os05g0159300	Esterase	2.03
		os.10381.1.s1_at	Loc_os06g06080	Os06g0154400	Serine esterase family protein	-1.60
		os.27802.1.s1_s_at	Loc_os02g43850	Os02g0655600		-1.69
	Lipid transfer protein.	os.18599.1.s1_at	Loc_os03g57970	Os03g0793800	Lipid transfer protein	2.08
		os.11519.2.s1_x_at	Loc_os11g33000	Os03g0766100	Prolamin	-2.50
		os.7935.2.s1_x_at	Loc_os07g46852	Os07g0663800	Sex determination protein tasselseed-2	-2.58
	Seed protein.	os.20863.1.s1_at	Loc_os01g62390	Os01g0848900		-4.62
		os.22594.1.s1_at	Loc_os01g03390	Os01g0124601	Bowman-Birk type trypsin inhibitor	-2.05
		os.7612.1.s1_at	Loc_os03g60840	Os03g0823400		-2.50
	Protease inhibitor.	os.9283.1.s1_at	Loc_os02g33070	Os02g0533800	ATPase inhibitor	-3.98
		os.10255.1.s1_s_at	Loc_os10g03850	Os10g0127900	F-box domain containing protein	-4.51
		os.53019.1.s1_at	Loc_os11g05740	Os11g0156000	B3 DNA binding domain containing protein	1.87
	Regulation of transcription. B3-domain-containing transcription factor family.	os.57527.1.s1_at	Loc_os04g48350	Os04g0572400	Dehydration-responsive element-binding protein 1D	1.58
		os.11094.1.a1_at	Loc_os04g46220	Os04g0546800	Ethylene-responsive transcription factor 2	-1.53
		os.7329.1.s1_s_at	Loc_os08g42550	Os08g0537900	AP2 domain containing protein	-1.60
		os.38447.1.s1_s_at	Loc_os06g07030	Os06g0166400	Ddehydration responsive element binding protein	-1.63
		os.32780.1.s1_at	Loc_os01g07120	Os01g0185100	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	-1.76
		osafix.15137.1.s1_s_at	Loc_os05g47650	Os05g0549800	DNA-binding protein RAV1	-2.02
		os.56144.1.s1_at	Loc_os03g64260	Os03g0860100	Ethylene responsive element binding protein	-2.08
		os.28406.1.s1_at	Loc_os09g11480	Os09g0287000	Callus-expressing factor	-2.47
		osafix.20360.1.s1_x_at	Loc_os10g26410	-		-1.51
		os.7694.1.s1_at	Loc_os04g41229	Os04g0489600		-1.90
RNA	Regulation of transcription. bHLH family.	os.1443.1.s1_a_at	Loc_os01g06640	Os01g0159800	DNA binding protein	-2.04
		os.53254.1.s1_at	Loc_os06g12210	Os06g0226500		-2.12
		os.9661.1.s1_at	Loc_os03g04620	Os03g0139500	CCT motif family protein	2.39
	Regulation of transcription. C2C2(Zn), Constans-like zinc finger family.	os.3400.1.s1_s_at	Loc_os02g49230	Os02g0724000	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 11	-1.99
		os.49294.1.s1_at	Loc_os09g33550	Os09g0509700	Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 15	-2.59
		os.46849.1.s1_at	Loc_os10g25230	Os10g0391400	ZIM domain containing protein	1.53
	Regulation of transcription. C2C2(Zn) GATA transcription factor family.	os.5151.1.s1_at	Loc_os03g52450	Os03g0734900	GATA transcription factor 25	-2.12
		os.7834.1.s1_at	Loc_os05g06340	Os05g0155400	GATA zinc finger family protein	-2.15
		os.18453.1.s1_at	Loc_os12g39400	Os12g0583700	Zinc-finger protein 1	-2.10
	Regulation of transcription. C2H3 zinc finger family.	os.51601.1.s1_at	Loc_os07g40300	Os07g0593000	Zinc finger protein 7	-3.05
		os.6318.1.s1_at	Loc_os05g45020	Os05g0525900	CCCH transcription factor	-2.39
		os.22665.1.s1_at	Loc_os03g01890	Os03g0109400	Rolled leaf1	-1.66
	Regulation of transcription. Homeobox transcription factor family.	os.9086.1.s1_at	Loc_os03g10210	Os03g0198600	DNA binding protein	-1.91
		os.51648.1.s1_at	Loc_os03g20910	Os03g0325600	Homeobox domain containing protein	-2.05
		os.51714.1.s1_at	Loc_os07g48560	Os07g0684900	WUSCHEL-related homeobox 11	-2.41
		osafix.29958.1.s1_x_at	Loc_os09g21180	Os09g0379600	Homeodomain leucine zipper protein CPHB-5	-2.94
		os.54934.1.s1_at	Loc_os05g37060	Os05g0442400	DNA binding protein	-1.53
	Regulation of transcription. MYB domain transcription factor family.	os.55636.1.s1_at	Loc_os05g48010	Os05g0553400	Anthocyanin regulatory C1 protein	-1.70
		os.9336.1.s1_at	Loc_os08g43550	Os08g0549000	Myb-related protein Zm38	-1.89
		os.2867.1.g4_s_at	Loc_os11g05470	Os11g0684000	DNA binding protein	-1.94
		os.408.1.s1_a_at	Loc_os01g74410	Os01g0975300	MYB59	-2.28
		osafix.6404.1.s1_at	Loc_os09g26170	-	MYB36	-2.34
	Regulation of transcription. NAC domain transcription factor family.	os.12199.1.s1_at	Loc_os01g66120	Os01g0884300	NAC domain-containing protein 48	-1.90
		os.18595.1.a1_at	Loc_os07g48450	Os07g0683200	NAC domain-containing protein 18	-2.08
		os.37548.1.s1_at	Loc_os05g34830	Os05g0421600	NAC domain-containing protein 48	-2.66
		os.35020.1.s1_at	Loc_os11g03300	Os11g0126900	NAC domain transcription factor	-2.71
		os.30568.1.s1_at	Loc_os01g60640	Os01g0821600	OsWRKY21	2.20
	Regulation of transcription. WRKY domain transcription factor family.	os.29979.1.s1_at	Loc_os01g09100	Os01g0186000	OsWRKY10	-1.63
		os.48082.1.s1_at	Loc_os09g25070	Os09g0417800	OsWRKY62	-1.74
		os.27039.1.s1_at	Loc_os08g38990	Os08g0499300	OsWRKY30	-1.85
		os.411.1.s1_a_at	Loc_os01g64730	Os01g0867300		-1.71
		os.19553.1.s1_at	Loc_os05g49420	Os05g0569300	G-box-binding factor	-1.83
DNA	Regulation of transcription. bZIP transcription factor family.	os.4770.1.s1_a_at	Loc_os01g06560	Os01g0159000	Tumor-related protein	-2.05
		os.1503.1.s1_at	Loc_os06g45140	Os06g0662200	Light-inducible protein CPRF-2	-2.47
		os.38249.2.s1_at	Loc_os01g38530	Os01g0566100	Early flowering 3	-2.29
		os.20204.3.s1_a_at	Loc_os02g12380	Os02g0215200	Histone deacetylase	-1.65
		osafix.30109.1.s1_at	Loc_os09g31380	Os09g0489200	Conserved hypothetical protein	-2.02
	Regulation of transcription. Pseudo ARR transcription factor family	os.26572.1.s1_at	Loc_os02g40510	Os02g0618200	Two-component response regulator-like PRR1	-1.93
		os.55065.1.s1_at	Loc_os06g04540	Os06g0136900	DNA-binding protein	-1.64
		os.14929.1.s1_at	Loc_os08g03610	Os08g0130100	LSD1	-2.18
	Transposon	os.8582.1.s1_at	Loc_os08g14109	Os08g0239300	Retrotransposon protein, Ty1-copia subclass	1.71
		os.27408.1.s1_at	Loc_os10g40050	Os10g0130500	Transposon protein, CACTA, En/Spm sub-class	-1.63
		os.11595.1.s1_at	Loc_os01g57599	Os01g0785300	Retrotransposon protein, unclassified	-1.66
		os.11595.1.s2_at	Loc_os01g63610	Os01g0785300		-2.13
		os.27497.1.s1_at	Loc_os12g12390	-	Transposon protein, Ac/Ds sub-class	-2.44
		os.27140.1.s1_a_at	Loc_os03g61910	Os03g0835200		-2.87
		os.27140.1.s1_a_at	Loc_os03g20080	Os03g0835200	Retrotransposon protein, unclassified	-2.87
		os.27140.1.s1_a_at	Loc_os08g43110	-		-2.87
		os.52731.1.s1_at	Loc_os01g37350	Os01g0554100	Retrotransposon protein, Ty3-gypsy subclass	-3.18
		os.27520.8.s1_x_at	Loc_os12g08564	Os12g0186600	Retrotransposon protein, unclassified	-4.19
Protein	Chromatin structure. Histone.	os.47290.1.s1_at	Loc_os04g34240	Os04g0419700	Histone H3	1.64
	Synthesis. Ribosomal prokaryotic.	os.11795.1.s1_a_at	Loc_os03g63950	Os03g0856500	Plastid-specific 30S ribosomal protein 1	-1.61
	Targeting.	os.22820.1.a1_at	Loc_os12g38110	Os09g0246500	Importin beta-1 subunit	-2.62
	Degradation.	os.52261.1.s1_at	Loc_os04g47360	Os04g0561500	Prolyl endopeptidase	2.37
	Degradation. Aspartate protease.	os.14491.1.s1_a_at	Loc_os04g26380	Os04g0330900	Pepsin A	-1.56
	Degradation. AAA type.	os.848.1.s1_at	Loc_os01g43480	Os01g0623500	ATP binding protein	-2.04
		os.10872.1.s1_at	Loc_os07g09420	Os07g0192000	ATPase 2	-2.18
		os.32943.2.s1_x_at	Loc_os01g12660	Os01g0226400	ATP binding protein	-2.41

Table 1.

Function category		Affymetrix ID	TIGR code	RAP-DB code	Gene name	FC
Protein	Posttranslational modification.	os.38295.1.s3_at	Loc_os02g07960	Os02g0176100	ATP binding protein	-1.66
		os.27170.1.s1_at	Loc_os01g50400	Os01g0699400	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	-1.77
		os.46687.1.s1_x_at	Loc_os10g25550	Os10g0395000	Serine/threonine-protein kinase NAK	-1.96
		os.38299.1.s1_at	Loc_os07g02330	Os07g0114000	Protein catalytic/ protein phosphatase type 2C	-2.00
				os11g0444900	PB1 domain containing protein	-2.02
		os.1310.1.s1_a_at	Loc_os12g02200	Os12g0113500		-2.26
		os.1310.1.s1_a_at	Loc_os11g02240	Os11g0113700	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 15	-2.26
		os.8095.1.s3_at	Loc_os03g22050	Os03g0339900		-2.27
		os.12007.1.s1_at	Loc_os03g24930	Os03g0364400	Protein kinase APK1A	-2.27
		os.15191.1.s1_s_at	Loc_os05g41220	Os05g0491200	SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-1	-2.65
		os.3710.1.s1_at	Loc_os02g35329	Os02g0559800	Zinc finger, C3HC4 type family protein	2.32
		os.9138.1.s1_at	Loc_os09g36500	Os09g0535500	RING-H2 finger protein ATL2A	1.87
		osaffx.19456.1.a1_at	Loc_os11g02250	Os11g0578225	Zinc finger, C3HC4 type family protein	1.63
		os.9901.1.s1_at	Loc_os03g22830	Os03g0351800	RHC1A	-1.51
		os.30433.1.s1_at	Loc_os01g55110	Os01g0755700	RING-H2 finger protein ATL2K	-1.60
	Degradation. Ubiquitin-RING.	os.1660.1.s1_at	Loc_os01g02200	Os01g0112500	Ubiquitin-protein ligase	-1.68
		os.22788.1.s1_at	Loc_os02g02830	Os02g0120600	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 9	-1.68
		os.19480.1.s1_at	Loc_os03g20870	Os03g0324900	Protein binding protein	-1.69
		os.11450.1.s2_a_at	Loc_os01g52110	Os01g0719100	RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1	-1.74
		os.5873.1.s1_at	Loc_os04g51400	Os04g0603200	Zinc finger, C3HC4 type family protein	-1.84
		os.50548.2.s1_x_at	Loc_os09g17620	Os09g0344900	Dendritic cell-derived ubiquitin-like protein	-1.90
		os.13901.1.s1_at	Loc_os01g67850	Os01g0905700	Protein binding protein	-1.93
		os.49563.3.s1_x_at	Loc_os02g42690	Os02g0639800	Zinc finger, C3HC4 type family protein	-2.01
		os.16128.2.s1_at	Loc_os10g35670	Os10g0500000	RNA-binding protein	-2.13
		os.49563.4.s1_x_at	Loc_os02g42690	Os02g0639800	Zinc finger, C3HC4 type family protein, expressed	-2.23
		os.7339.2.s1_at	Loc_os10g31850	Os10g0456800	RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 2	-2.28
		os.9393.1.s1_a_at	Loc_os10g30850	Os10g0445400	Ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding protein	-2.36
		os.16187.1.s1_at	Loc_os02g10630	Os02g0199800	C2 domain containing protein	-2.89
		os.55583.1.s1_x_at	Loc_os09g38110	Os09g0554200	RING-H2 finger protein ATL2A	-3.11
		os.35921.1.s1_at	Loc_os01g60730	Os01g0822800	RING-H2 finger protein ATL5A	-3.71
Signaling	Degradation. Ubiquitin-FBOX	os.21319.1.s1_at	Loc_os09g06770	Os09g0243200	Protein binding protein	-4.17
		os.3246.2.s1_at	Loc_os10g37830	-	ATPP2-A13	-1.68
		os.7408.1.s1_at	Loc_os05g35110	Os05g0425700	F-box/LRR-repeat protein 2	-1.87
		os.27520.4.s1_a_at	Loc_os10g30850	Os10g0127900	F-box domain containing protein, expressed	-2.20
		os.8945.1.s1_at	Loc_os06g39370	Os06g0594400	Protein kinase Kelch repeat:Kelch	-2.27
		os.17446.2.s1_at	Loc_os04g48270	Os04g0571300	ATPP2-A14	-2.31
		os.52157.1.s1_x_at	Loc_os11g34460	Os11g0547000	Adagio protein 1	-2.50
		os.26517.1.s1_at	Loc_os02g44990	Os02g0671100	F-box domain containing protein, expressed	-2.84
		os.15607.1.s1_at	Loc_os04g31120	Os04g0380300	Influenza virus NS1A binding protein isoform 3	-3.12
		os.17474.1.a1_at	Loc_os02g11790	Os02g0208700	Protein kinase Kelch repeat:Kelch	-3.14
		os.20482.1.s1_at	Loc_os03g02550	Os03g0116700	ATPP2-A13	-3.26
		os.26472.1.s1_at	Loc_os04g040630	Os04g0482300	Protein binding protein	-2.27
	Receptor kinases.	os.8000.1.s1_at	Loc_os08g06530	Os08g0162600	Rubredoxin family protein	1.58
		os.7123.3.s1_at	Loc_os02g13510	Os02g0228300	Receptor-like protein kinase 5 precursor	-1.55
		os.1606.1.s1_at	Loc_os04g56430	Os04g0659300	Protein CRK5	-1.61
		osaffx.5535.1.s1_x_at	Loc_os07g35540	Os07g0539700	Protein kinase	-1.73
		os.53673.1.s1_at	Loc_os04g01310	Os04g0103500	Serine/threonine-protein kinase receptor precursor	-1.83
		os.27046.2.s1_x_at	Loc_os01g02300	Os01g0113300	Receptor kinase ORK10	-1.95
		os.15426.1.s1_at	Loc_os07g35370	Os07g0538200	Receptor-like protein kinase homolog RK20-1	-2.19
		os.12664.1.s1_at	-	Os07g0542600	Receptor-like protein kinase RK20-1	-2.27
		os.26792.1.s1_at	Loc_os11g36160	Os11g0569600	Receptor-like protein kinase precursor	-2.36
		os.19584.1.a1_at	Loc_os07g35390	Os07g0538400	Serine/threonine kinase-like protein	-2.66
		os.1978.1.s1_at	Loc_os01g02290	Os01g0113200	Ser/Thr receptor-like kinase	-2.71
		os.26816.1.a1_s_at	Loc_os07g35410	Os07g0538700	Protein kinase	-2.78
	Calcium.	os.12018.1.s1_at	Loc_os07g42730	Os07g0619400	EF hand family protein	-1.55
		osaffx.11871.1.s1_s_at	Loc_os02g03020	Os02g0122600	EF-hand Ca2+-binding protein CCD1	-1.82
	Phosphoinositides.	osaffx.17948.1.s1_at	Loc_os09g28500	Os09g0458800	EF hand family protein	-2.70
		os.15197.1.s1_at	Loc_os03g51610	Os03g0726200	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 3	-3.08
	G-proteins.	os.28649.1.s1_at	-	Os01g0555100	TATA-binding protein associated factor 2N	1.85
		os.14076.1.s1_s_at	Loc_os02g44820	Os02g0668500	Cellular retinaldehyde-binding/triple function, C-terminal	-2.05
	Light.	os.19289.1.s1_a_at	Loc_os02g41550	Os02g0625000	Cryptochrome 2 apoprotein	-1.53
		os.23964.2.s1_x_at	Loc_os07g48520	Os07g0684400	Gamete-specific hydroxyproline-rich glycoprotein 2	-1.58
	unspecified.	os.38378.1.s1_a_at	Loc_os01g01340	Os01g0102900	Light-induced protein 1-like	-2.53
		os.18125.1.s1_at	Loc_os05g37950	Os05g0453500	Guanylyl cyclase	-3.17
Development	Organisation	os.11271.1.s1_a_at	Loc_os11g14544	Os11g0251400	Protein expressed protein	-2.12
		os.8700.1.s1_at	Loc_os02g16909	Os02g0269200	Dynein light chain LC6, flagellar outer arm	-3.11
		osaffx.14656.1.s1_at	Loc_os05g12320	Os05g0214300	mtN3 protein-like	3.52
		os.16044.1.s1_at	Loc_os02g30910	Os02g0513100	MTN3	3.04
		osaffx.31049.1.s1_at	Loc_os11g18870	-	OsFTL11	1.89
		os.54933.1.s1_at	Loc_os04g34490	Os04g0422300	Nodulin protein	1.83
		os.8120.1.s1_at	Loc_os04g33570	Os04g0411400	RCN4	1.51
		os.26933.1.s1_x_at	Loc_os10g34840	Os10g0490100	Ripening-related protein 3	-1.67
		os.16218.1.s1_at	Loc_os06g30370	Os06g0498800	OsMFT1	-1.73
		os.11287.1.s1_at	Loc_os06g50930	Os06g0725000	Senescence-associated protein DIN1	-1.74
		os.9481.1.s1_at	Loc_os04g31924	Os04g0388700	Nodulin-like protein	-1.78
		os.14849.1.s1_a_at	Loc_os06g49500	Os06g0708700		-1.96
		os.7779.1.s1_x_at	Loc_os05g01570	Os05g0106200	Protein nodulin-like protein	-2.19
		os.12735.1.s1_at	Loc_os11g44810	Os11g0671000	Auxin-repressed 12.5 kDa protein	-2.24
		os.12111.1.s1_at	Loc_os09g26620	Os09g0437500	Auxin-repressed protein	-2.74
		os.4974.1.s1_at	Loc_os11g31190	Os11g0508600	mtN3-like protein	-2.77
	Unspecified	os.27625.1.s1_at	Loc_os12g24020	Os12g0428000	Senescence-associated protein DIN1	-2.78
		os.27765.1.s1_at	Loc_os06g50080	Os06g0714800		-2.89
		os.4453.1.s1_at	Loc_os06g03520	Os06g0125200	Protein expressed protein	-3.81
		os.27080.1.s1_at	Loc_os02g36450	Os02g0574100	Sugar transport protein 5	-2.31
		os.26932.1.s1_at	Loc_os07g37320	Os07g0559700	Sugar carrier protein C	-2.52
		os.53709.1.s1_at	Loc_os02g36440	Os02g0574000	Sugar transport protein 5	-3.54
		os.25128.1.s1_at	Loc_os02g09810	Os02g0191300	Amino acid transporter-like protein	-1.92
		os.50583.1.s1_at	Loc_os03g60260	Os03g0817200	ANT1	-1.96
		os.12069.1.s1_at	Loc_os02g55890	Os02g0802500	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	-1.99
		osaffx.30533.1.s1_s_at	Loc_os10g25830	Os10g0397800	Mitochondrial carrier-like protein	-2.71
		os.20614.2.s1_at	Loc_os04g49757	Os04g0587500	ATPUP11	-1.54
		os.5614.1.s1_x_at	Loc_os06g42030	Os06g0625900	Potassium transporter 10	-2.11
		os.27139.1.a1_at	Loc_os02g39910	Os02g0612700	Protein binding protein	-2.42
Transport	Sugar.					
	Amino acid.					
	Mitochondrial membrane.					
	Nucleotide.					
	Potassium.					

Table 1.

Function category	Affymatrix ID	TIGR code	RAP-DB code	Gene name	FC
Not assigned	os.8570.4.s1_at	Loc_os09g32330	-	MTD1	-1.71
	os.54677.1.s1_at	Loc_os07g06490		Expressed protein	-1.71
	os.7029.1.s1_at	Loc_os05g24650			-1.71
	os.18980.1.a1_at	Loc_os12g07370		csAIPR5	-1.73
	os.55273.1.s1_at	-		NO_MATCH	-1.73
	os.27502.1.s1_s_at	-	-		-1.74
	os.9975.1.s1_at	-	-		-1.74
	os.11326.1.s1_at	Loc_os08g30510	Os08g0395700	Expressed protein	-1.75
	os.46444.1.s1_x_at	-	-	NO_MATCH	-1.76
	os.8557.1.s1_at	Loc_os05g05060	Os05g0142400	Expressed protein	-1.76
	os.18406.1.s1_at	Loc_os07g40220	Os07g0591700		-1.77
	os.25952.1.s1_at	Loc_os05g27780	Os05g0344200		-1.78
	os.9842.1.s1_at	-	-	NO_MATCH	-1.79
	os.4757.1.s2_at	Loc_os11g04409	-	Expressed protein	-1.80
	osaffx.13696.1.s1_at	Loc_os04g06734	Os04g0150766		-1.81
	os.11940.1.s1_at	Loc_os04g47310	Os04g0560700		-1.81
	os.52058.1.s1_at	Loc_os04g46600	Os04g0551600		-1.83
	os.5434.1.s1_at	Loc_os08g26850	Os08g0356800		-1.83
	os.56979.1.s1_at	Loc_os01g20894	Os01g0310600	Hypothetical protein	-1.84
	osaffx.15155.1.s1_at	Loc_os05g48730	-		-1.84
	os.49201.1.s1_at	Loc_os09g29820	Os09g0474000	BZIP family transcription factor	-1.84
	os.6152.1.s1_at	Loc_os05g08900	Os05g0181800	Expressed protein	-1.86
	os.17985.1.s1_s_at	Loc_os03g56500	Os03g0776400		-1.87
	os.27232.1.s1_at	Loc_os01g68650	Os01g0915000	Plant-specific domain TIGR01615 family protein	-1.88
	os.17325.1.s1_at	Loc_os03g03200	Os03g0123800	Hydrolase	-1.88
	os.11820.1.s1_at	-	Os02g0613200	Hypothetical conserved gene	-1.89
	os.49137.1.s1_at	Loc_os03g12879	Os03g0231300	Expressed protein	-1.90
	os.52393.1.s1_at	-	Os08g0530100	Nucleotide-diphospho-sugar transferase domain containing protein	-1.91
	os.54340.1.s1_x_at	-	-	NO_MATCH	-1.94
	os.54340.1.s1_at	-	-		-1.94
	os.30993.1.s1_at	Loc_os07g12390	Os07g0226200	Expressed protein	-1.95
	os.29815.1.s1_at	-	Os01g0962100	Hypothetical protein	-1.96
	os.53431.1.s1_at	Loc_os02g45860	Os02g0683800	Expressed protein	-1.97
	os.27541.1.a1_at	-	-	NO_MATCH	-1.98
	os.12038.1.s1_at	Loc_os01g65700	Os01g0879200	Expressed protein	-1.99
	os.39764.1.s1_x_at	-	-	NO_MATCH	-2.02
	os.6683.1.s1_at	Loc_os01g58130	Os01g0793800	Expressed protein	-2.03
	os.18404.1.s1_at	Loc_os02g30780	Os02g0511600	LGC1	-2.04
	os.50310.1.s1_at	Loc_os01g66544	Os01g0888900	Hypothetical protein	-2.04
	os.55059.1.s1_at	Loc_os03g53540	-		-2.06
	osaffx.15233.1.s1_x_at	-	Os06g0114650	Expressed protein	-2.08
	os.16999.1.a1_at	Loc_os03g24950	Os03g0364700		-2.08
	os.36205.1.s1_at	Loc_os01g57710	Os01g0786800		-2.09
	osaffx.23983.1.s1_at	Loc_os01g69840	Os01g0922700		-2.15
	os.11907.1.s1_at	Loc_os11g41600	Os11g0634200		-2.17
	os.52253.1.s1_at	Loc_os11g28420	Os11g0474100	unknown function DUF223 domain containing protein	-2.18
	os.53137.1.s1_at	-	Os07g0190600		-2.19
	os.53587.1.s1_at	Loc_os12g02720	Os12g0120100	unknown function DUF567 family protein	-2.19
	os.10214.1.s1_at	Loc_os01g69870	Os01g0923000	Expressed protein	-2.22
	os.50762.1.s1_at	-	-	NO_MATCH	-2.23
	osaffx.7038.1.s1_s_at	Loc_os11g07580	Os11g0177200	Expressed protein	-2.24
	os.49582.1.s1_at	Loc_os02g45930	Os02g0684400		-2.26
	os.52381.1.s1_at	-	-	NO_MATCH	-2.26
	os.27780.2.s1_a_at	Loc_os10g36260	Os10g0506900	Expressed protein	-2.27
	os.11147.1.s1_at	Loc_os07g37280	-	Hypothetical protein	-2.27
	os.3749.1.s1_at	-	Os01g0222600		-2.28
	os.39157.1.a1_at	Loc_os02g28334	-	Expressed protein	-2.29
	osaffx.30538.1.s1_x_at	Loc_os10g26150	Os10g0401000		-2.33
	os.50587.1.s1_at	-	Os05g0130300	Hypothetical protein	-2.34
	os.11802.1.s1_at	Loc_os03g51650	Os03g0726500	Expressed protein	-2.34
	osaffx.15233.1.s1_at	-	Os06g0114650		-2.35
	os.15580.1.s1_at	Loc_os03g42600	Os03g0624300		-2.38
	os.50263.1.s1_at	-	-	NO_MATCH	-2.39
	os.49217.1.s1_at	Loc_os03g14300	Os03g0247200	Expressed protein	-2.43
	os.6177.1.s1_at	Loc_os10g14180	Os10g0208500		-2.43
	os.56029.1.s1_at	-	Os12g0596300	DC1 domain containing protein	-2.45
	os.36350.1.a1_at	Loc_os04g09350	Os04g0173300	Expressed protein	-2.45
	os.12342.1.s2_at	Loc_os12g04204	-		-2.51
	os.20206.1.s1_at	Loc_os02g41840	Os02g0629000		-2.52
	os.34466.1.s1_s_at	Loc_os01g07970	Os01g0175100	Expressed protein	-2.53
	os.46029.1.a1_at	Loc_os01g48940	Os01g0681700		-2.53
	os.49079.1.a1_at	Loc_os04g51920	Os04g0608600	PDI-like protein	-2.55
	os.51372.1.s1_at	Loc_os03g36534	-	Expressed protein	-2.58
	osaffx.3262.1.s1_s_at	Loc_os03g17680	Os03g0285300		-2.61
	os.10580.1.s1_at	Loc_os01g34790	Os01g0532300		-2.62
	os.9886.1.s1_at	Loc_os04g02530	Os04g0115700		-2.63
	os.46304.1.s1_a_at	Loc_os06g45090	Os06g0661766		-2.64
	os.55256.1.s1_at	-	Os10g0467000	Hypothetical protein	-2.66
	os.32455.1.s1_at	Loc_os01g54670	Os01g0750500	Coiled-coil domain-containing protein 25	-2.69
	os.20548.1.s1_at	Loc_os04g51680	Os04g0606200	Expressed protein	-2.69
	os.22947.1.s1_a_at	-	-	NO_MATCH	-2.72
	os.50571.1.a1_at	Loc_os01g53779	Os01g0740300	Expressed protein	-2.73
	os.56154.1.s1_s_at	Loc_os09g07150	Os09g0246500		-2.75
	os.13646.1.s1_at	Loc_os09g07154	-		-2.75
	os.40036.1.a1_at	-	-	NO_MATCH	-2.77
	os.27798.1.s1_a_at	Loc_os07g34640	Os07g0530700	ATP/GTP-binding protein	-2.78
	os.10502.1.s1_at	Loc_os07g28614	-	Expressed protein	-2.80
	os.8850.1.s1_x_at	Loc_os09g04160	Os09g0128400	Expressed protein	-2.92
	os.22703.1.s1_at	Loc_os07g42650	Os07g0618700		-2.94
	os.45974.1.a1_at	-	-	NO_MATCH	-3.01
	os.57361.1.s1_at	-	Os08g0230600	LIM, zinc-binding domain containing protein	-3.36

Table 1.

Function category	Affymetrix ID	TIGR code	RAP-DB code	Gene name	FC
Not assigned	os.21803.1.s1_at	Loc_os06g24190	Os06g0349800	Expressed protein	-3.41
	os.27490.1.at_at	Loc_os01g29804	Os01g0392800		-3.45
	os.28200.1.s1_x_at	Loc_os03g61160	Os03g0826900	Expressed protein	-3.01
	os.39933.1.s1_x_at	Loc_os06g02440	Os06g0114650		-3.04
	os.29923.1.s1_at	Loc_os06g36380	Os06g0559000		-3.07
	os.12793.1.s1_x_at	Loc_os01g54340	Os01g0747300	Plant-specific domain TIGR01615 family protein	-3.09
	osaffx.30647.1.s1_x_at	Loc_os10g32940	Os10g0467000	Expressed protein	-3.09
	os.4999.1.s1_at	Loc_os06g50230	Os06g0716100		-3.20
	os.52377.1.s1_at	-	Os02g0227100	Hypothetical protein	-3.23
	os.9767.1.s1_at	Loc_os03g38950	Os03g0586500	Expressed protein	-3.32
	os.10736.1.s1_at	Loc_os06g05440	Os06g0147100		-3.33
	os.46842.1.s1_at	-	Os10g0466800	Hypothetical protein	-3.45
	os.50349.2.s1_at	Loc_os04g09580	Os04g0175400	Expressed protein	-3.48
	os.50349.2.s1_at	Loc_os04g09570	Os04g0175400		-3.48
	osaffx.4280.2.at_at	Loc_os05g08910	Os05g0181700	Hypothetical protein	-3.54
	os.14151.1.s1_at	Loc_os01g49310	Os01g0687300	Expressed protein	-3.59
	os.51029.1.s1_at	Loc_os09g02770	Os09g0115900	PE-PGRS family protein	-3.60
	os.27102.1.s1_x_at	Loc_os09g03960	-		-3.61
	os.27102.1.s1_x_at	Loc_os04g02530	-		-3.61
	os.27102.1.s1_x_at	Loc_os09g03960	-		-3.61
	os.27102.1.s1_x_at	Loc_os04g02530	-		-3.61
	os.10388.1.s1_at	Loc_os03g15920	Os03g0265900		-3.81
	os.26511.1.s1_at	Loc_os04g49370	Os04g0583200	Expressed protein	-4.01
	os.20863.2.s1_x_at	Loc_os01g62970	Os01g0848900		-4.12
	osaffx.3970.1.s1_at	Loc_os04g31760	-		-4.17
	os.53098.1.s1_at	Loc_os06g48500	Os06g0698711		-4.26
	os.21260.1.s1_at	Loc_os03g08580	Os03g0184100		-4.36
	os.11961.1.s1_at	Loc_os05g38040	Os05g0454500		-4.57
	os.38309.1.s1_at	Loc_os06g36390	Os06g0559400		-4.76
	os.11897.1.s1_at	Loc_os03g61150	-		-5.16

Affymetrix GeneChip Expression Array Probe set ID, <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>; The Michigan State University (MSU) (TIGR) Rice Genome Annotation Project, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>; The Rice Annotation Project (RAP) database, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>. FC, fold change [log2].

第四節 考察

本章の研究では、まず、GS1;2 欠損変異体の分げつ数減少が、アンモニウム給源に応答した表現型であるかどうか、また、腋芽の形成と伸長のどの過程の抑制に起因するかを明確とするため解析を行った。

GS1;2 欠損変異体イネでは、最終的な分げつ数および穂数の顕著な減少が観察されていたが (Funayama et al., 2013)、本研究により、充足濃度(1 mM)NH₄⁺供給下において、栄養成長期初期から分げつ数の減少が観察された(Figs. 2-5)。分げつは、主茎からだけでなく、発達した分げつからも形成される。従って、GS1;2 欠損変異体では、分げつ形成初期の分げつ数の減少が、最終的な分げつ数および穂数の顕著な減少(Funayama et al., 2013)につながると考えられる。また、植物では体内窒素環境が有効分げつの発達に影響することが知られているが(Mae, 1997; Sakakibara et al., 2006; Liu et al., 2011)、窒素栄養が、分げつ発達を制御する分子機構はよくわかっていない。本研究において、NH₄⁺初期同化酵素の GS1;2 の欠損が、充足濃度(1 mM)の NH₄⁺供給下での分げつ生長抑制を引き起こすことは、NH₄⁺の初期同化が分げつ生長に大きく関わることを推察させる。

分げつの生長過程では、まず、分裂組織を含む腋芽が形成され、そして、分裂組織は、有効分げつとなるか、または、休眠する (Hoshikawa, 1989; Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012)。これまでに、分げつや枝分かれの初段階の機構を解明することを目的として、様々な植物において腋芽の形成に影響を及ぼす変異体の単離が行われている。例えば、イネでは分げつ数が減少する *monocoll1* (Li et al., 2003) や *lax panicle* (Komatsu et al., 2003)が、さらに、トマト、シロイヌナズナ、イネでは、葉腋の分裂体の維持に必要な GRAS タンパク質遺伝子が欠損した *Ls*, *LAS*や *MOC1*が単離されている (Schumacher et al., 1999; Greb et al., 2003; Li et al., 2003)。加えて、腋芽の分裂開始に影響を与える RAX 遺伝子が欠損した変異体では、腋芽の形成阻害が観察されている (Müller et al., 2006)。しかし、以上の事例とは異なり、Fig. 2 で示しているように、GS1;2 欠損変異体では、腋芽が発生していた。電子顕微鏡観察などによる、発生した腋芽の分裂組織を含めた組織・細胞構造の詳細な解析は行っていないが、GS1;2 欠損変異体においては、腋芽の伸長抑制が観察されたことから、腋芽の形成不全ではなく、主に腋芽の伸長抑制により分げつ数が減少すると考えられる。これらの結果は、GS1;2 が窒素の利用性に応じて調節される分げつ生長(腋芽伸長)の分子機構に関与することを推察させる。

そこで、さらに、本章の研究では、イネ幼植物の腋芽を含む地上部基部の *in situ* hybridization 解析を行い、GS1;2 の地上部基部の組織・細胞分布を解析して、腋芽の伸長と GS1;2 の機能の関連性を明らかにすること、また、GS1;2 欠損変異体の地上部基部でのリグニン・デンプン粒蓄積や窒素・炭素含量の解析および網羅的な遺伝子発現変動と代謝産物の解析を行い、地上部基部の GS1;2 の生理学的役割を詳細に考察するための知見を得ることとした。

1 mM NH₄⁺供給下で栽培した野生型イネの 4 葉齢期幼植物の地上部基部組織においては、

GS1;2 mRNA は、節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束で高蓄積し(Fig. 8)、これらの組織・細胞群では、GS1 タンパク質の顕著な蓄積が確認された(Fig. 11)。上記の節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束では、*GS1;1* mRNA の蓄積量は低かった(Fig. 9)ことから、これらの組織・細胞群に蓄積した GS1 タンパク質は、主に *GS1;2* 遺伝子産物であることが示唆される。節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束は、分げつへの代謝産物の転流に重要な組織である(Hoshikawa, 1989; Fig. 7)。特に、篩部伴細胞は、篩管への輸送物質の積み込みを調節する細胞と考えられている(Van Bel, 1993)。従って、地上部基部における *GS1;2* は、節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束において、腋芽の伸長に必要な Gln の生合成を担うことが示唆される。他方、SAM や未成熟葉での *NADH-GOGAT* mRNA の蓄積(Fig. 10)は、これらの発達中の組織において、輸送されてきた Gln が、*NADH-GOGAT* の酵素反応により主要な遊離アミノ酸である Glu に変換されて再利用されていること示唆する。

また、イネの地上部基部ではリグニンの合成・蓄積が活発であるため(Ookawa and Ishihara, 1993; Ookawa et al., 1993)、リグニン合成経路の PAL の酵素反応によって NH_4^+ が多量に発生すると考えられる(Fig. 12)。先行研究では、若い葉の維管束の GS1 が PAL の酵素反応によって生じた NH_4^+ を再同化する役割を担う可能性が推測されていた (Sakurai et al., 2001; Cantón et al., 2005)。GS1;2 欠損変異体では、地上部基部の節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束での GS1;2 の欠損がリグニン蓄積を抑制し(Fig. 13)、その結果、分げつ形成・生長にかかわる木化が減少していると考えられる。網羅的な転写産物変動と代謝物の解析の結果では、GS1;2 欠損変異体の地上部基部で、リグニン合成経路の COMT やラッカーゼの遺伝子発現低下(Table 1, Figs. 17, 18)や高分子リグニン構造体に含まれるリグニン誘導体のシナピン酸が遊離の形態で高蓄積したこと(Fig. 21)から、PAL 以降の反応経路の阻害が生じていることも示唆された。

さらに、GS1;2 欠損変異体地上部基部における全窒素量や全炭素量の減少(Fig. 14)は、GS1;2 の欠損により、腋芽における篩部を介した Gln 供給が抑制され(Fig. 22a)、結果としての窒素栄養不足により、窒素・炭素代謝が著しく崩れ、スクロースの利用低下とデンプン粒の蓄積(Figs. 15, 22h)を招いていると考えられる。実際、網羅的に転写産物や代謝物の変動を解析した結果、1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した GS1;2 欠損変異体幼植物の地上部基部では、野生型と比較して、スクロース合成経路およびデンプン分解経路の関連遺伝子の発現低下(Figs. 17, 19)や、デンプンの蓄積とスクロース量の減少が認められた(Figs. 21, 22d, h)。また、アミノ酸、核酸、酸化型ペントースリン酸経路や TCA 回路に関わる遺伝子の発現抑制(Fig. 17)とともに、 NH_4^+ 初期同化産物である Gln や Gln から合成される Asn を含むアミノ酸類や有機酸類の減少が認められた(Figs. 21, 22a, b)。さらに、光化学系や硫黄代謝に関連する遺伝子の発現増加も認められ(Fig. 17)、GS1;2 欠損が、地上部基部における広範な代謝の変化を引き起こしていることが示唆される。この代謝の変化が腋芽の伸長の抑制を

引き起こしている可能性が考えられた。

以上、本章の研究から、先行研究(Funayama et al., 2013; Yamaya and Kusano, 2014)で報告された、イネ根の表層の表皮・外皮細胞の GS1;2 が吸収 NH_4^+ の初期同化を担うことに加えて、充足濃度 NH_4^+ 供給下において、イネ地上部基部の節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束の GS1;2 が、地上部基部組織での窒素の利用性とこれを介した炭素利用に大きく関わることや、リグニン合成の際に発生する NH_4^+ を再同化する役割を担うことが示唆された。GS1;2 欠損変異体では、これらに起因して、腋芽の伸長が抑制され、分げつ数の減少につながったと考えられた。

第三章 GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での植物ホルモンとの関連性の解析

第一節 緒言

GS1;2 欠損変異体イネでは、分げつ数が減少し、その結果、穂数が減少した(Funayama et al., 2013)。また、第二章の研究結果により、充足濃度 NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体において、腋芽の伸長抑制によって分げつ数が減少することが明らかになった。腋芽の伸長の制御には複数の要因が複雑に影響しあっており、その制御に関わる要因は、外的要因と内的要因に大別される(Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012; Domagalska and Leyser, 2011)。外的要因とは、光の強度や光の波長、物理的障害や土壌の栄養状態であり、内的要因とは、代謝産物の利用効率と植物ホルモンのシグナル伝達ネットワークである。

植物の腋芽の成長の調節には、サイトカイニンやオーキシンおよびストリゴラクトンの少なくとも3種類の植物ホルモンが関わる(Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012; Domagalska and Leyser, 2011; Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Müller and Leyser 2011; Waldie et al., 2014; Rameau et al., 2015)。オーキシンは、腋芽成長の阻害ホルモンであり、茎頂で合成されたオーキシンが、細胞底部に極性分布するPIN形成型オーキシン排出キャリアーにより、木部柔細胞間を求底的に下方へ極性移動する(Leyser, 2011)。現在までに、オーキシンが誘導する間接的な腋芽成長阻害機構の二つのモデルが提唱されている。一つ目は、オーキシン輸送の疎通モデルであり、このモデルでは、腋芽は活発に成長するためには主茎へオーキシンを排出する必要があるが、主茎中に高レベルのオーキシンが存在すると腋芽からのオーキシン排出が阻害されて、腋芽伸長が阻害される(Domagalska and Leyser, 2011; Müller and Leyser 2011)。二つ目は、セカンドメッセンジャーモデルである(Domagalska and Leyser, 2011; Müller and Leyser 2011; Waldie et al., 2014)。主茎のオーキシンは、AUXIN RESISTANCE PROTEIN1-AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN依存性経路を介して、ストリゴラクトンの生合成を上方制御し、かつ、サイトカイニンの生合成を下方制御する。腋芽中に移動したストリゴラクトンは、腋芽伸長を阻害し、また、サイトカイニンは腋芽伸長を促進する。また、根で生合成されたストリゴラクトンとサイトカイニンも求頂的に移動し、腋芽の成長に影響する(Domagalska and Leyser, 2011; Müller and Leyser 2011)。エンドウマメでは、この腋芽の成長制御が、*TEOSINTE BRANCHED1*や*CYCLOIDEA*および*PROLIFERATING CELL FACTORS 1/2*転写因子遺伝子のホモログである*BRANCHED1*の発現にストリゴラクトンとサイトカイニンが反対の効果を与えることにより生ずると考えられている(Braun et al., 2012; Dun et al., 2012)。

ストリゴラクトンは、根において、カロテノイドを出発物質として、カロテノイド酸化開裂酵素やシトクロム酸化開裂酵素などの種々の酵素による段階的な反応を経て生合成される(Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008)。また、ストリゴラクトンは、枝分か

れ抑制活性以外に、アーバスキュラー菌根菌との共生や寄生植物の発芽誘導のシグナル物質としても機能する(Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008)。現在、数種類のストリゴラクトン[*epi*-5 deoxystrigol (*epi*-5DS)、orobanchol、orobanchyl acetate、strigol など]のみ検出可能であるが、未発見のストリゴラクトンは、100種以上にも及ぶ可能性も指摘されている。また、検出されるストリゴラクトンの種類が、植物種や品種間で異なることが知られている(Yoneyama et al., 2012)。イネ幼植物の根では、*epi*-5DSは、リン栄養が十分な条件下ではほぼ検出されないのに対し、リン栄養が欠乏した条件下では、リン栄養十分条件の500倍以上の顕著な蓄積(約500 pg/gFW)が認められ、かつ、根の内生ストリゴラクトン量の増加と分げつ数の減少に強い相関関係があることが明らかとなった(Umehara et al., 2010)。さらに、イネ幼植物の根では、窒素欠乏条件においてもストリゴラクトンの量が増加することが示唆された(Yoneyama et al., 2012)。しかし、窒素欠乏条件下のイネにおけるストリゴラクトンと分げつ成長抑制との関連性は明らかになっていない(Yoneyama et al., 2012)。

また、近年、サイトカイニンと窒素の情報伝達の関連性が示唆されている(Kiba et al., 2011; Krouk et al., 2011; Krouk, 2016)。サイトカイニンの代謝と情報伝達が、窒素の利用性と強く関連していることが報告されており(Sakakibara et al., 1998; Taniguchi et al., 1998; Takei et al., 2001; 2004; Miyawaki et al., 2004; Krouk et al., 2011; Ruffel et al., 2011)、イネの節においても、窒素供給がサイトカイニン生合成関連遺伝子の発現を誘導し、サイトカイニン量を増加させることが報告された(Xu et al., 2015)、さらに、GS阻害剤のメチオニンスルフォキシミン(MSX)を用いた薬理学的解析から、イネの根において、GlnまたはGlnの代謝産物によってサイトカイニンの新規生合成が制御されていることが明らかとなり、地上部でも同様な制御が予想されている(Kamada-Nobusada et al., 2013)。この知見は、GSとサイトカイニン生合成の関連を示唆したが、特定のGS1イソ酵素が関連するののか否かは不明なままであった。ここで、第二章の研究より、イネの節と腋芽の維管束組織に局在するGS1;2が、節における窒素に依存したサイトカイニン生合成遺伝子の発現制御を介したサイトカイニン活性の調節に関与することが期待される。

植物における天然のサイトカイニンの主要な分子種は、 N^6 -プレニル化アデニン誘導體群である。通常、これらの誘導體群には、 N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenine (iP)、*trans*-zeatin (tZ)、*cis*-zeatin (cZ)、および dihydrozeatin (DZ)が含まれ、プレニル側鎖の終末端のヒドロキシル基の有無や立体異性配置が異なる(Mok and Mok, 2001; Sakakibara, 2006)。これらのサイトカイニンは、活性型遊離塩基(iP、tZ、cZ、DZ)と生合成前駆体[初期生合成体のリボチド型の5'-リン酸化iPリボシド群(iPRPs)、5'-リン酸化tZリボシド群(tZRP)、5'-リン酸化cZリボシド群(cZRP)および5'-リン酸化DZリボシド群(DZRP)、また、その後生成するリボシド型のiPリボシド(iPR)、tZリボシド(tZR)、cZリボシド(cZR)およびDZリボシド(DZR)]、および貯蔵体である不活性なグリコシド型から成る(Osugi and Sakakibara, 2015)。iP型やtZ型のサイトカイニンの新規合成の最初のステップは、アデノシンフォスフェイトイソペン

テニルトランスフェラーゼ (IPT)により触媒され、ジメチルアリルニリン酸とアデニンヌクレオチドからiPRPsが合成される(Sakakibara et al., 2006)。次に、シトクロームP450モノオキシゲナーゼ735A (CYP735A)が、iPRPsのプレニル側鎖の終末端をヒドロキシル化してtZRPが合成される(Sakakibara et al., 2006)。iPRPsやtZRPは、ホスホリボヒドロラーゼであるLONELY GUY (LOG)によって、それぞれの活性型であるiPやtZに直接変換される(Kurakawa et al., 2007)。また、リボチド型のiPRPsやtZRPは、リボシド型のiPRやtZRへ脱リン酸化されて、その後活性型の遊離塩基のiPとtZに変換されるが、この反応過程を触媒する酵素の遺伝子群は未だ同定されていない(Chen and Kristopeit, 1981a; 1981b)。

そこで、本章の研究では、充足濃度のNH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体イネ幼植物における腋芽の伸長阻害と植物ホルモンとの関連性を検討することを目的に、まず、NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体と対照(野生型と相補系統)の各幼植物において、根のストリゴラクトン(*epi*-5DS)の定量解析に加え、根と地上部および地上部基部の植物ホルモンの網羅的定量解析(ホルモノーム解析)を行った。特に、サイトカイニンとの関連性が示唆されたため、次に、サイトカイニン新規合成経路の酵素遺伝子やサイトカイニン情報伝達系遺伝子のmRNAの定量的発現解析と*in situ* hybridization法による組織・細胞分布を解析した。さらに、充足濃度のNH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体幼植物の腋芽伸長阻害が、サイトカイニンの外部供給で回復するかを検討した。

第二節 材料と方法

(1) 植物材料

イネの GS1;2 遺伝子の第 2 エキソンに *Tos17* が挿入された GS1;2 欠損変異イネ系統 [NF6488(-/-): *gs1;2*] および GS1;2 欠損変異体に、自己プロモーター制御下の *OsGS1;2* cDNA を再導入した相補系統(*gs1;2/OsGS1;2* line 1) (Funayama et al., 2013)ならびに遺伝背景の日本型イネ栽培品種日本晴(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) (野生型: WT) を用いた。

(2) 栽培条件

ストリゴラクトンの解析以外では、第二章第二節(2)と同様に、野生型と GS1;2 欠損変異体および相補系統の種子を塩水選後発芽させ、これらの幼植物を、発芽後から本学本農学研究科実験圃場の P1P 閉鎖系温室(26℃、5:30 から 18:30 まで補助光を点灯)にて、水耕栽培した。アンモニウム処理の場合は、1 mM NH₄Cl を含む 1 強度水耕液を毎週交換した。幼植物の地上部基部は、第二章第二節(2)と同様に調製した。

サイトカイニンの合成関連酵素遺伝子と情報伝達関連遺伝子の定量的発現解析と *in situ* hybridization 解析では、4 葉齢期の幼植物を用いた。ホルモノーム解析では、5 葉齢期の根と地上部および地上部基部を用いた。

グルタミンの添加効果の解析では、GS1;2 欠損変異体と野生型の幼植物を、0.5 mM Gln または 1 mM NH₄Cl を単独窒素源として水耕栽培した。サイトカイニンの添加効果の解析では、GS1;2 欠損変異体と野生型の幼植物を、1 mM NH₄Cl を単独窒素源として 3 葉齢期まで水耕栽培し、その後、活性型の iP と tZ、前駆体型的 iPR と tZR および人工合成型の 6-benzylaminopurine (BAP)を 10 nM の濃度で含む水耕液で、5 葉齢期まで栽培した。第一分げつの腋芽と地上部の長さは、5 葉齢期に測定した。

短時間の NH₄⁺供与後の地上部基部における遺伝子発現解析と Gln の定量には、上記と同様に水耕栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体を、水のみにて 3 日間栽培して窒素枯渇処理を行った後、1 mM NH₄Cl 処理または無窒素処理した。この遺伝子発現解析では、7 葉齢期の幼植物を 8 時間 1 mM NH₄Cl 処理または無窒素処理した。また、Gln 定量では、4 葉齢期の幼植物を 24 時間 1 mM NH₄Cl 処理または無窒素処理した。短時間の NH₄⁺供与後の根における遺伝子発現解析では、発芽後の野生型幼植物を、5 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)-NaOH 緩衝液 (pH 5.5)で pH5.5 に調製した水で 18 日間栽培して種子栄養を涸渇させた後、1 mM NH₄Cl を添加または無添加した水で 8 時間栽培した。

根の内生ストリゴラクトンの測定のためのイネ幼植物の栽培は、Umehara ら (2010)の方法を一部改変して行った。栽培は、東北大学大学院生命科学研究科生理活性動態分野(山口信次郎教授)の植物栽培用チャンバー(FLI-2000H, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)、または、同大学院農学研究科植物環境応答実験施設の植物栽培用チャンバー[FLI-

2000H-C 高照度ユニット(HLU-50 型: 高演色形メタルハライドランプ MT400DL/BUD) 付, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.]を用いて行った。野生型と GS1;2 欠損変異体を、それぞれ 6~9 個体ずつ以下のように栽培した。

籾を取り除いた種子を、2.5%(v/v) 次亜塩素酸水溶液を用いて 15 分間殺菌した(Kamachi et al., 1992)。殺菌後、次亜塩素酸水溶液を捨て、滅菌水で洗浄した後、さらに滅菌水を約 5 mL 加え、30°Cの暗所にて 2 日間インキュベートすることにより発芽を促した。発芽した種子は、1 強度水耕液(Mae and Ohira, 1981)を含む 0.6%(w/v)寒天培地に移植した。移植 5 日後、一個体ずつスポンジを巻き、12 mL 褐色瓶(バイアル瓶 褐色 No3.)(Maruemu Corporation, Osaka, Japan)に移植し、1 強度の水耕液を用いて栽培を行った。さらに、発芽後 12 日目には、60 mL 褐色瓶(バイアル瓶 褐色 No7.)(Maruemu Corporation, Osaka, Japan)に移植し直し、1 強度の水耕液を用いて一週間の栽培を行った。水耕液の減少が著しい場合は、水耕液を追加した。水耕液中の窒素源としては、10 μ M、250 μ M、および 1000 μ M の各濃度の NH_4Cl を用いた。

(3) ストリゴラクトンの定量

内生ストリゴラクトンは、地上部では微量なため検出できない。そのため、本研究では根の内生ストリゴラクトンの定量を行った。ただし、ストリゴラクトンは水耕液中にも放出されるため、水耕液を用いて定量することもできる。ストリゴラクトンの定量実験は、東北大学大学院生命科学研究科生理活性動態分野にて、Umehara らの(2008; 2010)の方法に従って以下のように行った。

(a) 植物試料のサンプリングと破碎およびストリゴラクトンの粗抽出

新鮮重を測定した野生型と GS1;2 欠損変異体の幼植物の根を、50 mL チューブ内で冷 acetone 5 mL に浸した状態で、根が 1~2 mm 程度の長さになるまでハサミを用いて、細かく裁断した。根の裁断終了後、内部標準物質として、d1-*epi*-5DS、d1-orobanchol をそれぞれ 50 pg~200 pg 加えた。なお、内部標準物質を加えることによって、仮に以降の操作において根の内生ストリゴラクトンを損出しても、内部標準物質と同じ比率で損出していることになり、ストリゴラクトンの定量値を補正できる。ついで、裁断された根は、ポリロンホモジナイザー(CENTRAL SCIENTIFIC COMMERCE, INC., Tokyo, Japan)を用いて、組織破碎した。破碎したサンプルを、10 分間静置した後、上清を 10 mL 試験管に移し、ヒートブロックで 40°Cに加温しながら窒素気流下で濃縮乾固した。

(b) 溶媒による分画

試験管中の乾固した試料に、ethyl acetate 2 mLを加え、試料がこぼれないように、注意深く攪拌し、さらに水 4 mLを加えて攪拌した。遠心操作によって ethyl acetate 層(油層; 上層)と水層(下層)に分離させ、ストリゴラクトンが溶解している上層の ethyl acetate

層(油層)を新しい 10 mL 試験管に移し、ヒートブロックで 40℃に加温しながら窒素気流下で濃縮乾固した。

(c) 逆相カラムクロマトグラフィーによる分画

溶媒分画後乾固させた試料を、逆相カラム(1 mL Oasis HLB Column, Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan)を用いてクロマトグラフィーにて精製した。まず、Oasis HLB Column に、acetone 1 mL、水 1 mL、20%(v/v) acetone 1 mL を順次添加し、カラムの平衡化を行った。乾固試料に、acetone 200 µL を加え、攪拌後に、水 800 µL を加え、さらに攪拌し、試料を完全に溶解させた。溶解した試料は、平衡化済みの Oasis HLB Column に添加し、サンプルのカラムへの吸着を行った。サンプルのカラムへの吸着後、20%(v/v) acetone 1 mL を 2 回加え、カラムの洗浄を行った。新しい試験管にカラムを移し、80%(v/v) acetone 1 mL を 3 回加え、精製サンプルの溶出を行った。溶出した試料は、ヒートブロックで 40℃に加温しながら窒素気流下で濃縮乾固した。

(d) 順相カラムクロマトグラフィーによる分画

最終精製標品は、順相カラム(1 mL Sep-pak Silica Column, Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan)を用いてクロマトグラフィーにて精製した。Sep-pak Silica Column に、ethyl acetate 1 mL、水 1 mL、n-hexane 1 mL を順次添加し、カラムの平衡化を行った。乾固試料に、ethyl acetate 150 µL を加えて混和した後、n-hexane を 850 µL 加えて、さらに混和を行い、試料を完全に溶解させた。次に、平衡化が済んだ Sep-pak Silica Column に試料を添加し、カラムへの吸着を行った。試料のカラムへの吸着後、ethyl acetate:n-hexane (15:85) 1 mL を 2 回添加し、カラムの洗浄を行った。新しい試験管にカラムを移し、ethyl acetate: n-hexane (50:50) 1 mL を 3 回加え、試料を溶出させた。溶出させた最終精製標品は、Savant Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)を用いて、遠心濃縮乾固させた。

(e) 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)解析

乾固した最終精製標品に、ethyl acetate 200 µL を加えて混和溶解後、LC-MS/MS 用 96 穴プレートに ethyl acetate に溶解させた試料を移した。Savant SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)を用いて遠心濃縮乾固させた後、水と acetonitrile をそれぞれ 10 µL ずつ加え、計 20 µL のサンプル溶液とした。LC-MS/MS [an ultra high performance liquid chromatography (Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japan), a reverse phase column (Acquity UPLC BEH-C18, ϕ 2.1 × 50 mm, 1.7 µm, Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan), a quadrupole/time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600, AB SCIEX, Tokyo, Japan)]を用いて、ストリゴラクトンの定量解析を行った。

(4) ホルモノーム解析

本研究室にて、野生型とGS1;2欠損変異体および相補系統を5葉齢まで栽培し、地上部基部と地上部および根をサンプリングした後、理化学研究所環境資源科学研究センターの榎原均博士(現名古屋大学大学院生命農学研究科教授兼任)に植物ホルモンの網羅的解析を依頼した。ホルモンの網羅的解析では、Kojimaら(2009)の方法と同様に、Ultra-Performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (AQUITY UPLC™ System/XEVO-TQS, Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan) with an octadecylsilyl (ODS) column (AQUITY UPLC HSS T3, 1.8 mm, 2.1×100 mm, Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan)を用いて、サイトカイニン、オーキシシン、アブシジン酸、ジベレリン、サリチル酸、ジャスモン酸を定量した。

(5) 各*OsIPT*分子種と*OsCYP735A*分子種および*OsRR*分子種のcDNAクローニング

cDNA クローニングした遺伝子の遺伝子名と The Rice Annotation Project (RAP-DB, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) Locus (遺伝子座) No. (Sakai et al., 2013)を以下に記す。

*OsIPT*分子種

OsIPT1 (Os03g0358900)、 *OsIPT2* (Os03g0356900)、 *OsIPT3* (Os05g0311801)、
OsIPT4 (Os03g0810100)、 *OsIPT5* (Os07g0211700)、 *OsIPT7* (Os05g0551700)、
OsIPT8 (Os01g0688300)

OsCYP735A 分子種

OsCYP735A3 (Os08g0429800)、 *OsCYP735A4* (Os09g0403300)

*A-type response regulator (OsRR)*分子種

OsRR1 (Os04g0442300)、 *OsRR2* (Os02g0557800)、 *OsRR3* (Os02g0830200)、 *OsRR4*
(Os01g0952500)、 *OsRR5* (Os04g0524300)、 *OsRR6* (Os04g0673300)、 *OsRR7*
(Os07g0449700)、 *OsRR8* (Os08g0376700)

上記の遺伝子の塩基配列に特異的な primer [本章本節(9)]を用いた RT-PCR により、*OsIPT1*、*OsIPT3*、*OsIPT7*および*OsRR1–OsRR8*の翻訳領域(CDS)の一部あるいは*OsIPT2*、*OsIPT4*、*OsIPT5*、*OsIPT8*、*OsCYP735A3*および*OsCYP735A4*の全長 CDS の cDNA を獲得した。RT-PCR の鋳型となる一本鎖 cDNA は、total RNA を RNeasy plant kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて抽出後、得られた RNA を PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO INC., Siga, Japan)により逆転写して獲得した。ついで、PCR 反応は、KOD Fx NEO DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて行った。得られた PCR 産物を pCR-4Blunt-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)へ

とクローニングし、挿入 cDNA の全長配列を DNA シーケンス解析(Takara 社受託解析) にて確認した。

(6) 定量的リアルタイムPCR

OsIPT 分子種、*OsCYP735A* 分子種、*A-type response regulator (OsRR)* 分子種および *actin1* (accession No. KC140126) の各 mRNA の定量的リアルタイム PCR(qPCR) 解析には、それぞれ特異的な primer[本章本節(9)]を用いた。qPCR には Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用い、95°C 10 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒と 60°C 34 秒を 50 サイクルの条件下で PCR 反応を行った。また、mRNA 量を定量するにあたり、*OsIPT* 分子種、*OsCYP735A* 分子種、*OsRR* 分子種および *actin1* の cDNA クローンをスタンダードとして用いて定量を行った。

(7) 遊離アミノ酸の抽出と測定

4 葉齢期まで、1 mM NH₄Cl 存在下で水耕栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体を、水で栽培して 3 日間窒素枯渇処理を行った後、1 mM NH₄Cl で 24 時間処理し、地上部基部をサンプリングした。アミノ酸の抽出と定量は、第二章第二節(11)と同様に行った。

(8) *in situ* hybridization法を用いた *OsIPT4* と *OsARR1* および *OsARR2* の各 mRNA の細胞分布解析

プローブの作製は、以下のように DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用いて行い、*in situ* hybridization 法解析は、第二章第二節(6)と同様に行った。

OsIPT4 の 3'側非翻訳領域の 200 bp の DNA 断片を、特異的な primer[本章本節(9)]を用いた RT-PCR により増幅し、pBluescriptII SK (-) (Agilent Technology, CA, USA)にクローニングした。この鋳型プラスミドを *Bam*H I で処理後、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、*OsIPT4* mRNA に特異的に結合する DIG 標識 antisense 鎖 RNA probe を作成した。また、この鋳型プラスミドを *Hind*III で処理し、T3 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、コントロールとして用いる DIG 標識 sense 鎖 RNA probe を作成した。

OsRR1 あるいは *OsRR2* のプローブ作成のための鋳型プラスミドには、本章本節(5)にて獲得した、*OsRR1* あるいは *OsRR2* の CDS の一部が pCR-4Blunt-TOPO に挿入されたコンストラクトを用いた。*OsRR1* の鋳型プラスミドを、*Spe* I で処理後、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、DIG 標識 antisense 鎖 RNA probe を作成した。同様に、*OsRR1* 鋳型プラスミドを *Not* I で処理し、T3 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、コントロールの DIG 標識 sense 鎖 RNA probe を作成した。また、*OsRR2* の鋳型プラスミドを、*Not* I で処理し、T3 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、DIG 標識 antisense 鎖 RNA probe を作成し、同様に、

OsRR2 鋳型プラスミドを *Spe* I で処理後、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、コントロールの DIG 標識 sense 鎖 RNA probe を作成した。

(9) primer の塩基配列

本章の研究で用いた遺伝子特異的プライマーの塩基配列を以下に示した。

Purpose	Gene	RAP-DB ^a	RGAP ^b	Name	Sequence
cDNAクローンの獲得	<i>OsIPT1</i>	Os03g0358900	LOC_Os03g24440	IPT1-F	5'- ACCAAGCCCAAGGTTATCTTCGTGC -3'
				IPT1-R	5'- TCGTCGGTGACCTTGTGGTGATGA -3'
	<i>OsIPT2</i>	Os03g0356900	LOC_Os03g24240	IPT2-CF	5'- AAGTCCAAGCTCGCCATCTC -3'
				IPT2-CR	5'- GGTGACCTTGTTCGTGATGAT -3'
	<i>OsIPT3</i>	Os05g031200	LOC_Os05g24660	IPT3-F	5'- AGGCGAACACGTGGAGTCTG -3'
				IPT3-R	5'- CCACCTTCAACTCCAGCACTCT -3'
	<i>OsIPT4</i>	Os03g0810100	LOC_Os03g59570	IPT4-CF	5'- TCACCACCATCATCACCATGCAAGC -3'
				IPT4-CR	5'- TAAGTAGGTTGGTGCCTGCGCTTCT -3'
	<i>OsIPT5</i>	Os07g0211700	LOC_Os07g11050	IPT5-CF	5'- CAGCGTCAGCAGGAGCAT -3'
				IPT5-CR	5'- CGCGGCCGTGAAGTCC -3'
	<i>OsIPT7</i>	Os05g0551700	LOC_Os05g47840	IPT7-F	5'- AGGATACGAGGATGGTGGTGAT -3'
				IPT7-R	5'- CCGTCATAGAGCTGAATCTTGTC -3'
	<i>OsIPT8</i>	Os01g0688300	LOC_Os01g49390	IPT8-CF	5'- ATGGAGAGAAGCAGAGTCGGGACG -3'
				IPT8-CR	5'- TCTCGTCTATCGCCGCGTCGAGGCT -3'
	<i>OsCYP735-A3</i>	Os08g0429800	LOC_Os08g33300	CYP735A3-CF	5'- ATGGTCACTGGCAATGTCAAAGACTCCCAAGCCC -3'
				CYP735A3-CR	5'- TTACAAAAACATTAATTGCCGATAAAATTACGTA -3'
				CYP735A4-CF	5'- CTGAATTTCTTGCGCGCGCAATGGCGGTCTCTGTG -3'
	<i>OsCYP735-A4</i>	Os09g0403300	LOC_Os09g23820	CYP735A4-CR	5'- CTACACGCACCATATTACCAGCCGGGCGCACTGACA -3'
	<i>OsRR1</i>	Os04g0442300	LOC_Os04g36070	A-type RR1-F	5'- AGGATCAGCAGATGCATGAATG -3'
				A-type RR1-R	5'- GAGACGCTGTACGTCTTGCTT -3'
	<i>OsRR2</i>	Os02g0557800	LOC_Os02g35180	A-type RR2-F	5'- ACGATCTTCTCAAAGCCATCAAG -3'
				A-type RR2-R	5'- TGAGAGGCTTAAGGATGAATCCT -3'
	<i>OsRR3</i>	Os02g0830200	LOC_Os02g58350	A-type RR3-F	5'- CAGGTTTCGATCTCCTCAAGAG -3'
				A-type RR3-R	5'- CGAATTCTCCGACGACATTAGC -3'
	<i>OsRR4</i>	Os01g0952500	LOC_Os01g72330	A-type RR4-F	5'- TCTTCTGAGAATGTGCCTGCAA -3'
				A-type RR4-R	5'- GCTTGACAGTTTCAGGAAGAACT -3'
	<i>OsRR5</i>	Os04g0524300	LOC_Os04g44280	A-type RR5-F	5'- ACCGAATGTGAGCATGATTATCA -3'
				A-type RR5-R	5'- CCTGACCTTCTCAGGAGTTCATA -3'
	<i>OsRR6</i>	Os04g0673300	LOC_Os04g57720	A-type RR6-F	5'- GTCCCCAACGTCAACATGATC -3'
				A-type RR6-R	5'- CACGTTCTCCGACGACATGAT -3'
	<i>OsRR7</i>	Os07g0449700	LOC_Os07g26720	A-type RR7-F	5'- TGCTCAAGAAGATCAAGGAATCG -3'
				A-type RR7-R	5'- GGCACGTTCTCTGACGACATTAT -3'
	<i>OsRR8</i>	Os08g0376700	LOC_Os08g28900	A-type RR8-F	5'- CCAGACATGACCGGCTATAACC -3'
				A-type RR8-R	5'- AAGCAATTACAACCGGGAGATG -3'
リアルタイムPCR	<i>OsIPT1</i>	Os03g0358900	LOC_Os03g24440	IPT1-F	5'- ACCAAGCCCAAGGTTATCTTCGTGC -3'
				IPT1-R	5'- TCGTCGGTGACCTTGTGGTGATGA -3'
	<i>OsIPT2</i>	Os03g0356900	LOC_Os03g24240	IPT2-RF	5'- AAGTCCAAGCTCGCCATCTCCATCG -3'
				IPT2-RR	5'- GGTGACCTTGTTCGTGATGATGGGA -3'
	<i>OsIPT3</i>	Os05g031200	LOC_Os05g24660	IPT3-F	5'- AGGCGAACACGTGGAGTCTG -3'
				IPT3-R	5'- CCACCTTCAACTCCAGCACTCT -3'
	<i>OsIPT4</i>	Os03g0810100	LOC_Os03g59570	IPT4-RF	5'- GTACGAGTGTGCTTCTCCTCTGGGTC -3'
				IPT4-RR	5'- CCAGATGCCCTGGAGTAGTCGGGTG -3'
	<i>OsIPT5</i>	Os07g0211700	LOC_Os07g11050	IPT5-RF	5'- CAGCGTCAGCAGGAGCATGGTAGCG -3'
				IPT5-RR	5'- CGCGGCCGTGAAGTCTCGTCCGGG -3'
	<i>OsIPT7</i>	Os05g0551700	LOC_Os05g47840	IPT7-F	5'- AGGATACGAGGATGGTGGTGAT -3'
				IPT7-R	5'- CCGTCATAGAGCTGAATCTTGTC -3'
	<i>OsIPT8</i>	Os01g0688300	LOC_Os01g49390	IPT8-RF	5'- CGAGGAGCTCGAGGAATACTTCGCG -3'
				IPT8-RR	5'- TCTCGTCTATCGCCGCGTCGAGGCT -3'

Purpose	Gene	RAP-DB ^a	RGAP ^b	Name	Sequence
リアルタイムPCR	OsCYP735-A3	Os08g0429800	LOC_Os08g33300	CYP735A3-RF	5'- TCAC TGGGCAATGTCAAAGACTCCC -3'
				CYP735A3-RR	5'- AGGAGAGGTGTTCTTGGCCTTGTTT -3'
	OsCYP735-A4	Os09g0403300	LOC_Os09g23820	CYP735A4-RF	5'- GTTCGTTTTGGCGCCATAGCTAGAG -3'
				CYP735A4-RR	5'- CGCACCATTATACCAGCCGGGCCAC -3'
	Osactin1	Os03g0718100	LOC_Os03g50885	Actin-F	5'- CTTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA -3'
				Actin-R	5'- CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA -3'
	OsRR1	Os04g0442300	LOC_Os04g36070	A-type RR1-F	5'- AGGATCAGCAGATGCATGAATG -3'
				A-type RR1-R	5'- GAGACGCTGTACGTCTTGCTT -3'
	OsRR2	Os02g0557800	LOC_Os02g35180	A-type RR2-F	5'- ACGATCTTCTCAAAGCCATCAAG -3'
				A-type RR2-R	5'- TGAGAGGCTTAAGGATGAAATCCT -3'
	OsRR3	Os02g0830200	LOC_Os02g58350	A-type RR3-F	5'- CAGGGTTCGATCTCCTCAAGAG -3'
				A-type RR3-R	5'- CGAATTCTCCGACGACATTAGC -3'
	OsRR4	Os01g0952500	LOC_Os01g72330	A-type RR4-F	5'- TCTTCTGAGAATGTGCCTGCAA -3'
				A-type RR4-R	5'- GCTTGACAGTTTCAGGAAGAACT -3'
	OsRR5	Os04g0524300	LOC_Os04g44280	A-type RR5-F	5'- ACCGAATGTGAGCATGATTATCA -3'
				A-type RR5-R	5'- CTTGACCTTCTCAGGAGTTTATA -3'
	OsRR6	Os04g0673300	LOC_Os04g57720	A-type RR6-F	5'- GTCCCAACGTCAACATGATC -3'
				A-type RR6-R	5'- CACGTTCTCCGACGACATGAT -3'
	OsRR7	Os07g0449700	LOC_Os07g26720	A-type RR7-F	5'- TGCTCAAGAAGATCAAGGAATCG -3'
				A-type RR7-R	5'- GGCACGTTCTCTGACGACATTAT -3'
	OsRR8	Os08g0376700	LOC_Os08g28900	A-type RR8-F	5'- CCAGACATGACCGGCTATAACC -3'
				A-type RR8-R	5'- AAGCAATTACAACCGGAGATG -3'
in situ hybridizationのprobeに 用いたコンストラクトの作成	OsIPT4	Os03g0810100	LOC_Os03g59570	IPT4-ISF	5'- GTACGAGTGCTGCTTCCTCTG -3'
				IPT4-ISR	5'- CCAGATGCCCTGGAGTAGT -3'
	OsRR1	Os04g0442300	LOC_Os04g36070	A-type RR1-ISF	5'- AGGATCAGCAGATGCATGAATG -3'
				A-type RR1-ISR	5'- GAGACGCTGTACGTCTTGCTT -3'
	OsRR2	Os02g0557800	LOC_Os02g35180	A-type RR2-ISF	5'- ACGATCTTCTCAAAGCCATCAAG -3'
				A-type RR2-ISR	5'- TGAGAGGCTTAAGGATGAAATCCT -3'

^a The Rice Annotation Project (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)

^b Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)

(10) サイトカニン添加処理による腋芽の長さの測定

サイトカニン添加処理実験では GS1;2 欠損変異体と野生型の幼植物を、1 mM NH₄Cl を単独窒素源として 3 葉齢期まで水耕栽培し、その後、活性型の iP と tZ、前駆体型の iPR と tZR および人工合成型の 6-benzylaminopurine (BAP) を 10 nM の濃度で含む水耕液で、5 葉齢期まで栽培した。第一分げつの腋芽と地上部の長さは、5 葉齢期に測定した。測定方法は、第二章第二節(4)と同様に行った。

第三節 結果

(1) GS1;2 欠損変異体のストリゴラクトン量の解析

ストリゴラクトンは、地上部では検出できないほど微量である。そこで、野生型と GS1;2 欠損変異体の幼植物の根のストリゴラクトンの定量解析を行った。まず、対照実験として、リン栄養欠乏処理した野生型イネ幼植物の根のストリゴラクトンの定量解析を行った。その結果、Umehara ら(2010)と同様に、イネ根では、リン栄養欠乏により *ent-20-epi-5-deoxystri-5-gol* (*epi-5DS*)が顕著に蓄積した(Fig. 23)。orobanchol や orobanchyl acetate のような、他のストリゴラクトンは検出されなかった。イネにおける *epi-5DS* の蓄積が、腋芽の伸長を抑制し、分げつ数を減少させることが判明している(Umehara et al., 2008; 2010)。

続いて、不足(0.01 mM, 0.25 mM)と充足(1 mM)の濃度の NH_4^+ を供与して 2 週間栽培した幼植物の根の内在性 *epi-5DS* 量を測定した。野生型と GS1;2 欠損変異体の根のいずれにおいても、0.01 mM NH_4^+ 処理と 0.25 mM NH_4^+ 処理では、1 mM NH_4^+ 処理よりも *epi-5DS* 量はわずかに増加したが、野生型と GS1;2 欠損変異体の *epi-5DS* 量に統計的に有意な差はなかった(Fig. 23)。さらに、リン栄養欠乏処理下の野生型および 1mM NH_4Cl 処理下の野生型と GS1;2 欠損変異体を、さらに 5 葉齢まで生長させて、根の *epi-5DS* 量を解析した。リン栄養欠乏条件の野生型の根では、およそ 100 pg/g FW まで *epi-5DS* が蓄積したのに対し、1mM NH_4Cl 処理下の各幼植物の根では、2 週間栽培した幼植物根と同程度の *epi-5DS* 量であった(range 1.0–2.5 pg/g FW)。

以上、リン栄養欠乏条件下とは異なり、GS1;2 欠損変異体における *epi-5DS* 含量は低く、充足濃度 NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体における腋芽伸長の抑制と内生の *epi-5DS* 量の関連性は極めて低いことが判明した。

(2) GS1;2 欠損変異体イネ地上部基部、地上部および根の植物ホルモン定量解析

1 mM NH_4^+ 供給下で栽培した野生型と GS1;2欠損変異体および相補系統の幼植物の地上部基部と地上部および根において、植物ホルモン(サイトカイニン、オーキシン、ジベレリン、アブシジン酸、サリチル酸およびジャスモン酸)の網羅的解析を行った(Fig. 24, Table 2)。

ここで、本研究では、遊離塩基型と前駆体型のサイトカイニン分子種を合わせて、「サイトカイニン型」と呼称する。解析した NH_4^+ 供給した幼植物の全てで、地上部基部の主要なサイトカイニン分子種は、iP型とtZ型であり、これらの含量は、根や地上部の含量と比べて極めて高かった(Fig. 24a)。野生型と比較して、GS1;2欠損変異体では、地上部基部のtZ型含量が顕著に減少したが、相補系統の地上部基部では、tZ型含量が野生型と同等に回復した(Fig. 24a)。 NH_4^+ 供給下のGS1;2欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、iP型とtZ型のサイトカイニン前駆体(iPRとtZRおよびtZRP)の含量が著減した(Fig. 24b)。同様に、 NH_4^+ 供給下のGS1;2欠損変異体の地上部のtZ型前駆体(tZRとtZRP)含量は地上部基部より

も微量であるが、野生型と比較して減少した(Fig 24b)。イネでは、iP型とtZ型のサイトカイニン前駆体は窒素栄養に応答して蓄積する(Kamada-Nobusada et al., 2013)が、変異体の地上部と地上部基部でのこれらのサイトカイニン前駆体の減少は、相補系統では回復した(Fig. 24b)。

cZ型サイトカイニンは、解析した全ての幼植物の根において多量に蓄積したが(Fig. 24a; Kamada-Nobusada et al., 2013)、cZ型サイトカイニンの活性は、一般に弱い、あるいは、イネ種子根伸長抑制でのみtZ型サイトカイニンと同等である(Kudo et al., 2012)。また、解析した全ての幼植物の根と地上部および地上部基部で、DZ型サイトカイニンは極微量にしか検出できなかった(Fig. 24a)。DZ型サイトカイニンの植物の発達における機能は不明なままである(Zalabák et al., 2014)。NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体の地上部基部のcZ型とDZ型のサイトカイニン含量は、野生型よりも低かったが(Fig. 24a)、cZ型とDZ型の遊離型と前駆体の個々の含量は両植物間で統計的に有意な差は無かった(Table 2)。さらに、tZ-9-*N*-glucoside (tZ9G)以外の個々のグルコシド型サイトカイニン含量や全グルコシド型サイトカイニン含量も、変異体と野生型および相補系統の間でほぼ同等であった(Table 2)。

従って、GS1;2欠損が、地上部基部での、iP型やtZ型のサイトカイニン前駆体の顕著な減少を引き起こし、そして、地上部基部のサイトカイニン型全量の減少につながったと判明した。

野生型や相補系統と比較して、GS1;2欠損変異体における、オーキシシン[インドール酢酸(IAA)とその誘導体]とアブシジン酸(ABA)およびジャスモン酸の含量は同程度であったが、GS1;2欠損変異体の根と地上部基部では、活性型ジベレリンの前駆体であるGA₁₉およびGA₅₃(Yamaguchi, 2008)の含量が減少し、また、GS1;2欠損変異体の地上部基部ではサリチル酸含量が増加した(Table 2)。ジベレリンは、イネの枝分かれを抑制し(Lo et al., 2008; Rameau et al., 2015)、サリチル酸の蓄積は、生体防御を高めるだけでなく、サイトカイニン量を増加させ、枝分かれを促進することが報告されている(Kamada et al., 1992; Sano et al., 1994; O'Brien and Benková, 2013)。従って、ジベレリンとサリチル酸の含量の変化は、GS1;2欠損変異体の腋芽の伸長抑制との関連性が低いと考えられた。

(3) サイトカイニン新規合成の初発反応を担う酵素遺伝子の発現変動の解析

NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体の地上部基部では、iP型とtZ型のサイトカイニン前駆体が顕著に減少した。そこで、1 mM NH₄⁺供給下で栽培した4葉齢期のGS1;2欠損変異体と野生型の地上部基部において、iP型とtZ型のサイトカイニン前駆体の新規合成の初期過程を担うIPTとCYP735Aの各遺伝子の発現レベルを定量的リアルタイムPCRによって解析した。本研究で用いた日本型栽培品種イネの日本晴では、8分子種の*OsIPT*遺伝子(*OsIPT1*—*OsIPT8*)が同定されており、偽遺伝子の*OsIPT6*以外の各*OsIPT*遺伝子は異なる器官特異的な発現特性を示す(Sakamoto et al., 2006)。野生型イネの地上部基部では、*OsIPT4*と*OsIPT7*および*OsIPT8*のmRNAが検出され、*OsIPT4*の発現レベルは、*OsIPT7*と*OsIPT8*の各発現

レベルと比較して、各々5.7倍と4.5倍高かった(Fig. 25a)。これより、イネ地上部基部においては、*OsIPT4*が支配的な分子種であることが示唆された。GS1;2欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、これらの*IPT*遺伝子の内、*OsIPT4*のmRNA発現レベルのみが有意に変化し、約60%まで減少した(Fig. 25a)。また、*OsCYP735A3*と*OsCYP735A4*は、サイトカイニンのトランスヒドロキシレースをコードする(Maruyama et al., 2014)が、野生型の地上部基部では*OsCYP735A4* mRNAのみが検出され、かつ、GS1;2欠損変異体と野生型との間に*OsCYP735A4*の発現レベルの差はなかった(Fig. 25b)。従って、NH₄⁺供給下において、GS1;2欠損が、幼植物地上部基部の*OsIPT4*の発現レベルの低下に関わることが判明した。

次に、イネ幼植物地上部基部において、*OsIPT4*遺伝子が窒素供給に応答して発現するかどうかを調べた。窒素涸渇処理後の野生型幼植物においては、*OsIPT4* mRNAの定常状態の蓄積レベルは、根や葉と比較して、地上部基部で極めて高かった(Fig. 26)。さらに、窒素涸渇処理後の野生型幼植物にNH₄⁺を供給すると、地上部基部の*OsIPT4* mRNAの発現レベルが顕著に増加した(Fig. 27a)。しかし、この*OsIPT4* mRNAの発現レベルの増加は、窒素涸渇処理後にNH₄⁺供給したGS1;2欠損変異体の地上部基部では見られなかった(Fig. 27a)。NH₄⁺供給誘導的な*OsIPT4*発現は、窒素涸渇処理したイネ幼植物の根でも認められた(Fig. 28a; Kamada-Nobusada et al., 2013)。Kamada-Nobusadaら(2013)は、GS酵素活性の阻害剤であるMSXで処理したイネ幼植物根では、このNH₄⁺供給誘導的な*OsIPT4*の発現が失われることから、NH₄⁺供給後の*OsIPT4*発現誘導のシグナルは、Glnまたはその代謝産物であると結論した。窒素涸渇処理後の根にNH₄⁺を供給した野生型とGS1;2欠損変異体の両幼植物の地上部基部ではGlnが蓄積したが、野生型と比較して、GS1;2欠損変異体の地上部基部でのGln増加量は低かった(Fig. 27c)。これに対し、Glnを唯一の窒素源として供給して栽培した場合には、野生型とGS1;2欠損変異体の地上部基部での*OsIPT4* mRNAの発現レベルは同等であった(Fig. 29a)。以上の知見は、幼植物地上部基部において、GS1;2欠損に起因したGln含量の低下が、Gln応答性の*OsIPT4*の発現レベルの低下を引き起こし、その結果としてサイトカイニン前駆体の含量の減少が生じたことを示唆した。

(4) サイトカイニン新規合成の初発反応を担う酵素遺伝子の組織・細胞分布の解析

*OsIPT4*のプロモーター領域の下流にβ-glucuronidaseレポーター遺伝子を融合させたキメラ遺伝子を導入した遺伝子組換えイネを解析した先行研究によって、根の維管束や葉の篩部における組織特異的な*OsIPT4*のプロモーター活性の局在が明らかになっている(Kamada-Nobusada et al., 2013)。そこで、GS1;2欠損変異体の地上部基部における組織・細胞レベルでの*OsIPT4* mRNAの発現の変化を調べるため、1 mM NH₄⁺供給下で栽培した野生型とGS1;2欠損変異体の4葉齢期幼植物の地上部基部組織の縦断切片に対して、*OsIPT4* mRNAに特異的なprobeを用いた*in situ* hybridization解析を行った(Fig. 30)。その結果、野生型およびGS1;2欠損変異体において、*OsIPT4* mRNAのシグナルが、主に篩網維管束の篩

部伴細胞に検出された(Fig. 30a, b, d, e)。しかし、GS1;2欠損変異体の*OsIPT4* mRNAのシグナル強度は、野生型と比較して、極めて低かった(Fig. 30a, b, d, e)。ネガティブコントロールとして用いたsense鎖のprobeでは、シグナルはバックグラウンド程度であった(Fig. 30c, f)。

OsGS1;2 mRNAもまた、節網維管束の篩部伴細胞において発現していることから(Fig. 8i)、NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体の地上部基部において、GS1;2欠損による節網維管束の篩部伴細胞でのGlnの利用性の低下が、この細胞での*OsIPT4* mRNAの発現レベルの低下を引き起こしたことが示唆された。

(5) イネの茎頂および腋芽の分裂組織におけるサイトカイニン誘導性遺伝子の発現の解析

イネにおいて、SAMの維持には、SAMの上部の限定的な部分での局所的なサイトカイニンの活性化が必要である(Kurakawa et al., 2007)。そこで、Kurakawaら(2007)の方法に従い、1 mM NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体と野生型の4葉齢期幼植物の地上部基部のSAMと腋芽分裂組織(axillary bud meristem: AM)における活性型サイトカイニンの局所レベルを、活性型サイトカイニン誘導性遺伝子であるtype-A response regulator (RR)遺伝子(Tsai et al., 2012)のmRNAの*in situ* hybridization解析によって調査した。

これに先立ち、1 mM NH₄⁺供給下の野生型の地上部基部において、イネの13分子種のtype-A RR遺伝子(Tsai et al., 2012)の内の8分子種(*OsRR1*—*OsRR8*; Jain et al., 2006)の発現レベルを定量解析した結果では、*OsRR1*と*OsRR2*および*OsRR6*のmRNAが多量に発現していた(Fig. 31)。この結果は、NH₄⁺供給下の地上部基部で、局所的なサイトカイニンの活性化が生じていることを示唆した。*OsRR6*は、ストレス誘導的に発現するため(Jain et al., 2006)、本研究では、*OsRR1*と*OsRR2*に着目した。*OsRR1*と*OsRR2*の各mRNAに特異的なprobeを用いて*in situ* hybridization解析を行った結果、野生型およびGS1;2欠損変異体のSAMの上部細胞群と野生型のAMの上部細胞群において、*OsRR1*と*OsRR2*の各mRNAのシグナルが検出された(Fig. 32a, b, e, i, j, m)。しかし、GS1;2欠損変異体のAMでは、*OsRR1*と*OsRR2*の各mRNAのシグナルが検出されなかった(Fig. 32f, n)。ネガティブコントロールのsense鎖のprobeを用いた場合では、シグナルはバックグラウンド程度であった(Fig. 32c, d, g, h, k, l, o, p)。

以上の結果は、NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体幼植物のAMでは、活性型サイトカイニンが欠乏していることを示唆した。

(6) サイトカイニンの添加による腋芽伸長の解析

NH₄⁺供給下のGS1;2欠損変異体の腋芽の伸長抑制が、腋芽における前駆体型サイトカイニン量の減少に起因していることが示唆された。そこで、サイトカイニンを外部供給することにより、GS1;2欠損変異体の腋芽の伸長抑制が回復するかどうか調べた。GS1;2欠損変異体と野生型の幼植物を、1 mM NH₄Clを単独窒素源として3葉齢期まで水耕栽培し、その後、

活性型のiPとtZ、前駆体型のiPRとtZRおよび人工合成型の6-benzylaminopurine (BAP)を10 nMの濃度で含む水耕液で、5葉齢期まで栽培した。第一分げつの腋芽と地上部の長さは、5葉齢期に測定した。その結果、GS1;2欠損変異体の腋芽の伸長は、各サイトカイニンの処理によって、野生型の長さには達しないが部分的に回復した(Fig. 33a, b)。特に、活性型の遊離塩基型サイトカイニンと前駆体型サイトカイニンを添加した場合には、無処理の場合と比較して、約3倍の腋芽の伸長が見られた(Fig. 33b)。

この結果は、GS1;2 欠損変異体において、根に外部供給したサイトカイニンが、維管束組織を通じて、根から AM へ移行し、AM の活性型サイトカイニンの不足をある程度補償したことを示唆した。また、この結果より、GS1;2 欠損変異体の AM では、局所的なサイトカイニンの活性化が生じていないことが、強く支持された。

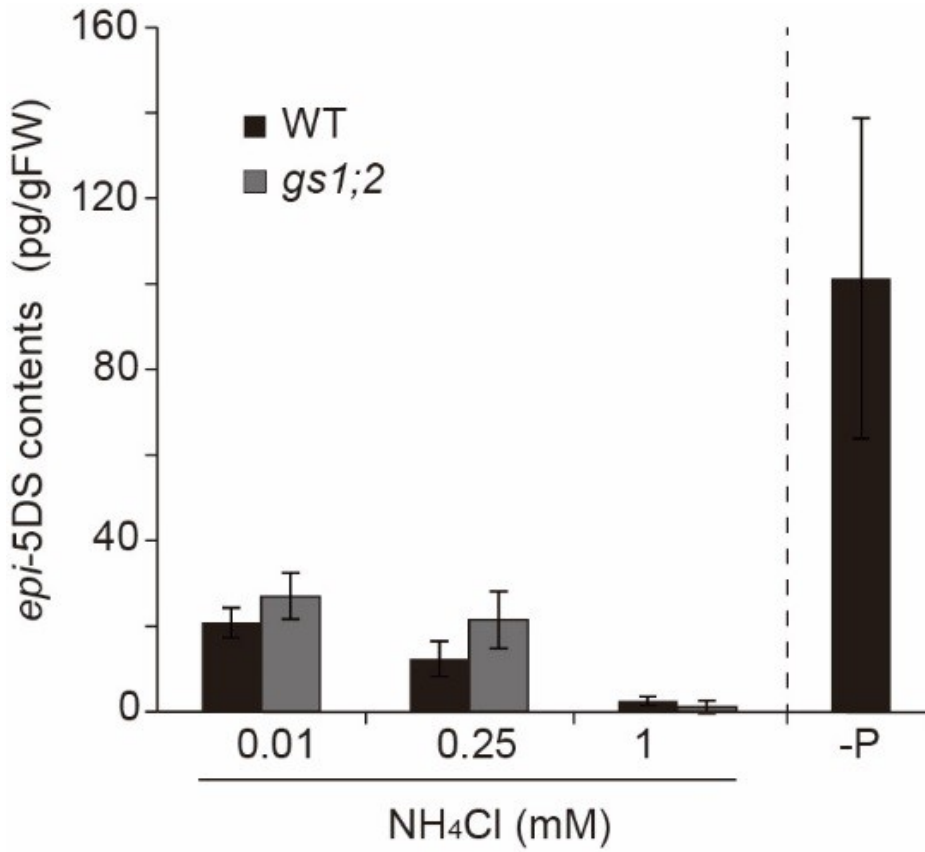


Figure 23. Analyses of endogenous content of *epi*-5-deoxystigol (*epi*-5DS) in roots of wild-type rice (WT) (black columns) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (gray columns) in the presence of either 0.01, 0.25, or 1 mM NH₄⁺ and the absence of phosphate (-P). Means values plus the SD of three independent plants are indicated.

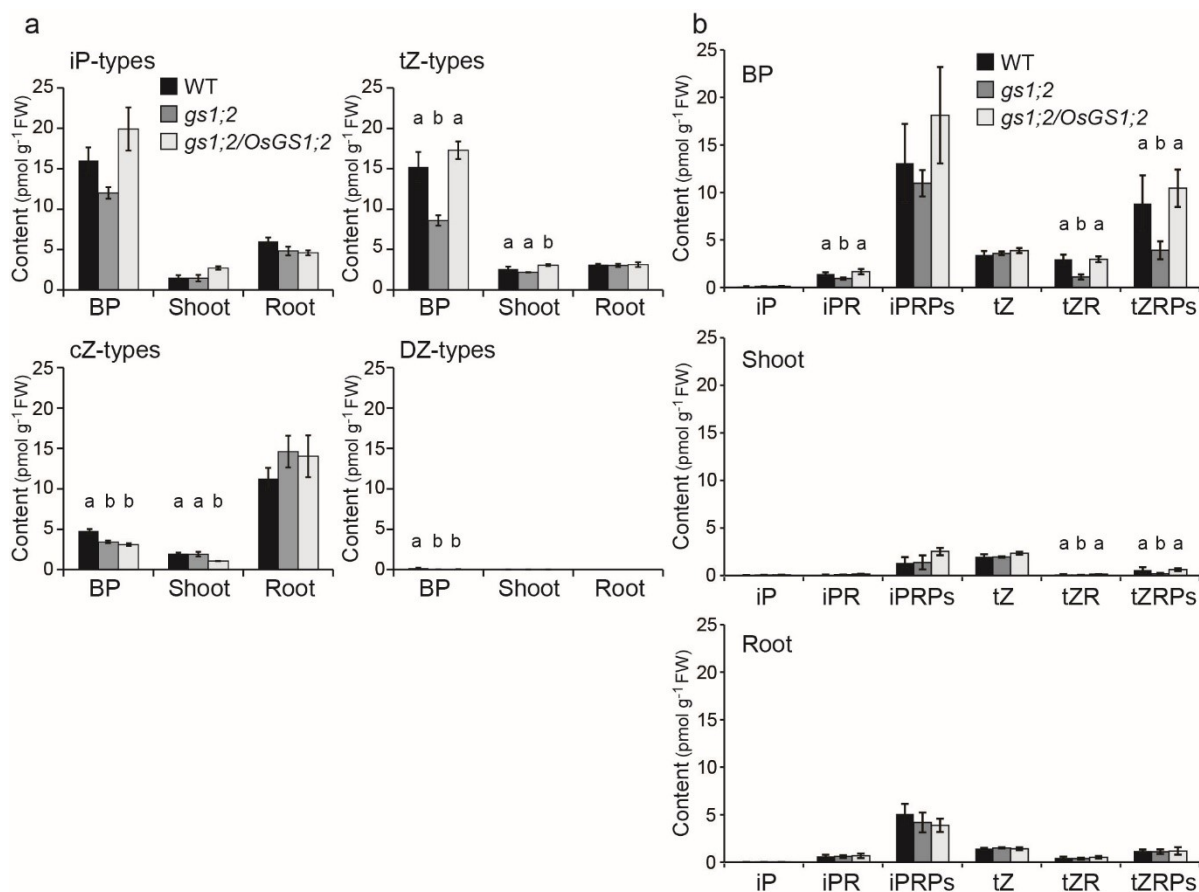


Figure 22. Free base and precursor cytokinin contents in the basal parts of shoots (BP), whole shoots and whole roots of wild-type rice (WT) (black columns), the *gs1;2* mutant (gray columns), and the *gs1;2/OsGS1;2* complementation line (light gray columns) at the fifth-leaf stage. (a) The summation of contents of iP-types (iP + iPR + iPRPs), tZ-types (tZ + tZR + tZRP), cZ-types (cZ + cZR + cZRP), and DZ-types (DZ + DZR + DZRP). (b) Contents of iP- and tZ-type cytokinins. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences in cytokinin contents between the WT, *gs1;2* and *gs1;2/OsGS1;2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

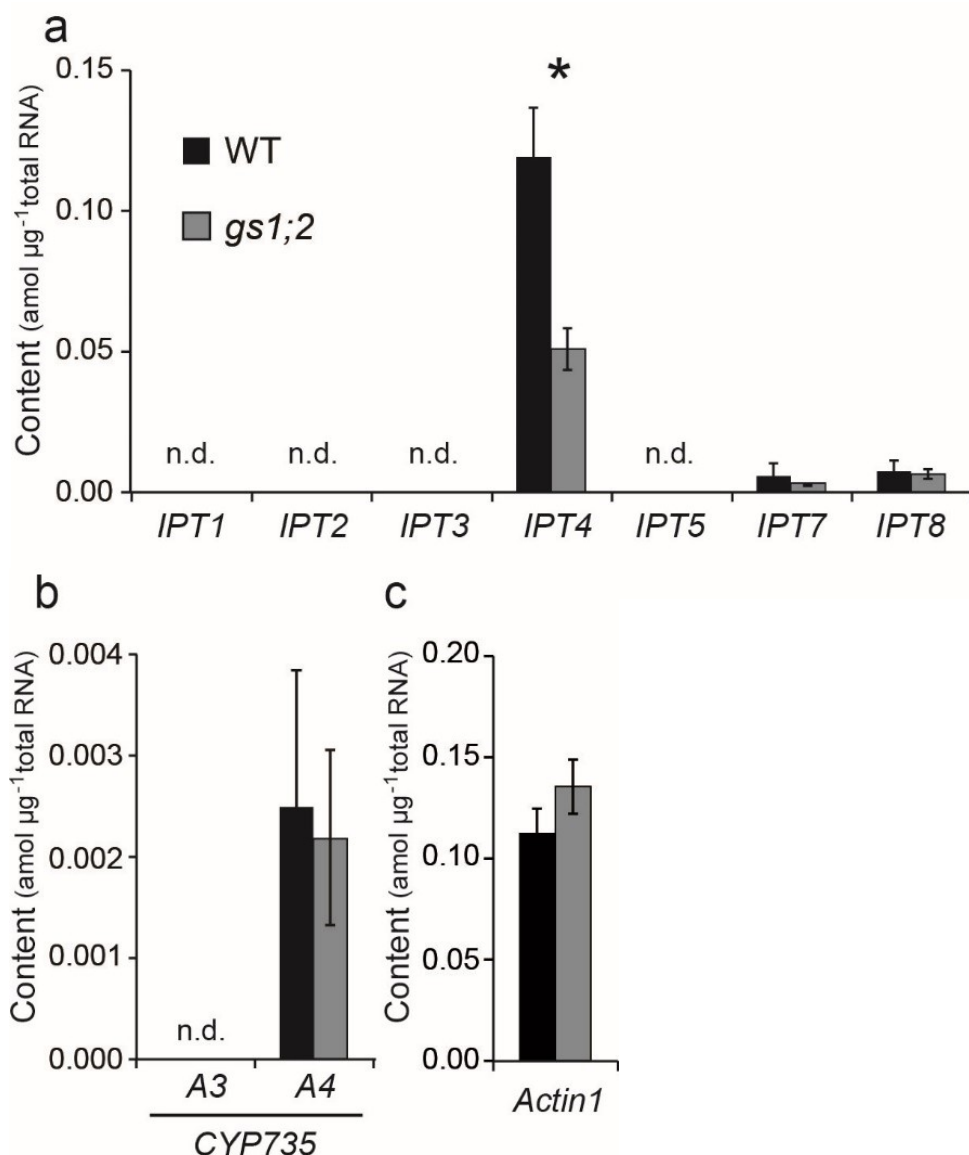


Figure 25. Expression of transcripts for cytokinin *de novo* biosynthetic genes in the shoot basal parts of wild-type rice (WT) (black columns) and the *gs1;2* mutant (*gs1;2*) (gray columns) at the 4th-leaf stage. (a) Adenosine phosphate-isopentenyltransferase genes (*OsIPT1*–*OsIPT5*, *OsIPT7* and *OsIPT8*). (b) Cytochrome P450 monooxygenase 735A genes (*OsCYP735A3* and *OsCYP735A4*). (c) Expression of *Actin1* used as a control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . Total RNA prepared from each tissue were subjected to quantitative real-time PCR (qPCR). The transcript for each gene was quantified using the corresponding purified cDNA clone as a calibration standard. Mean values plus the SE of three independent plants are indicated. n.d., not detected. The asterisk denotes the statistically significant difference between the WT and *gs1;2* (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

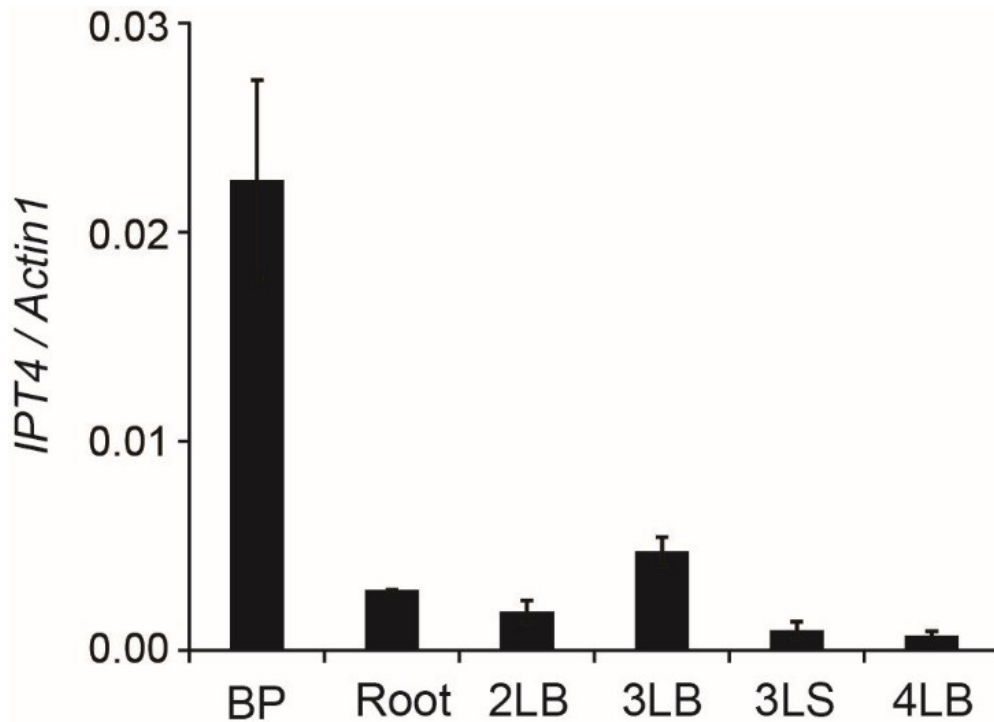


Figure 26. Accumulation of *adenosine phosphate-isopentenyltransferase 4* (*OsIPT4*) transcripts in whole roots and various shoot parts of wild-type rice grown hydroponically in water for 18 d. BP, shoot basal parts; 2LB, second leaf blades; 3LB, third leaf blades; 3LS, third leaf sheaths; 4LB, expanding fourth leaf blades. qPCR analysis was carried out as in Fig. 23. Expression of the *OsIPT4* transcript was normalized to that of the *Actin1* transcript. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated.

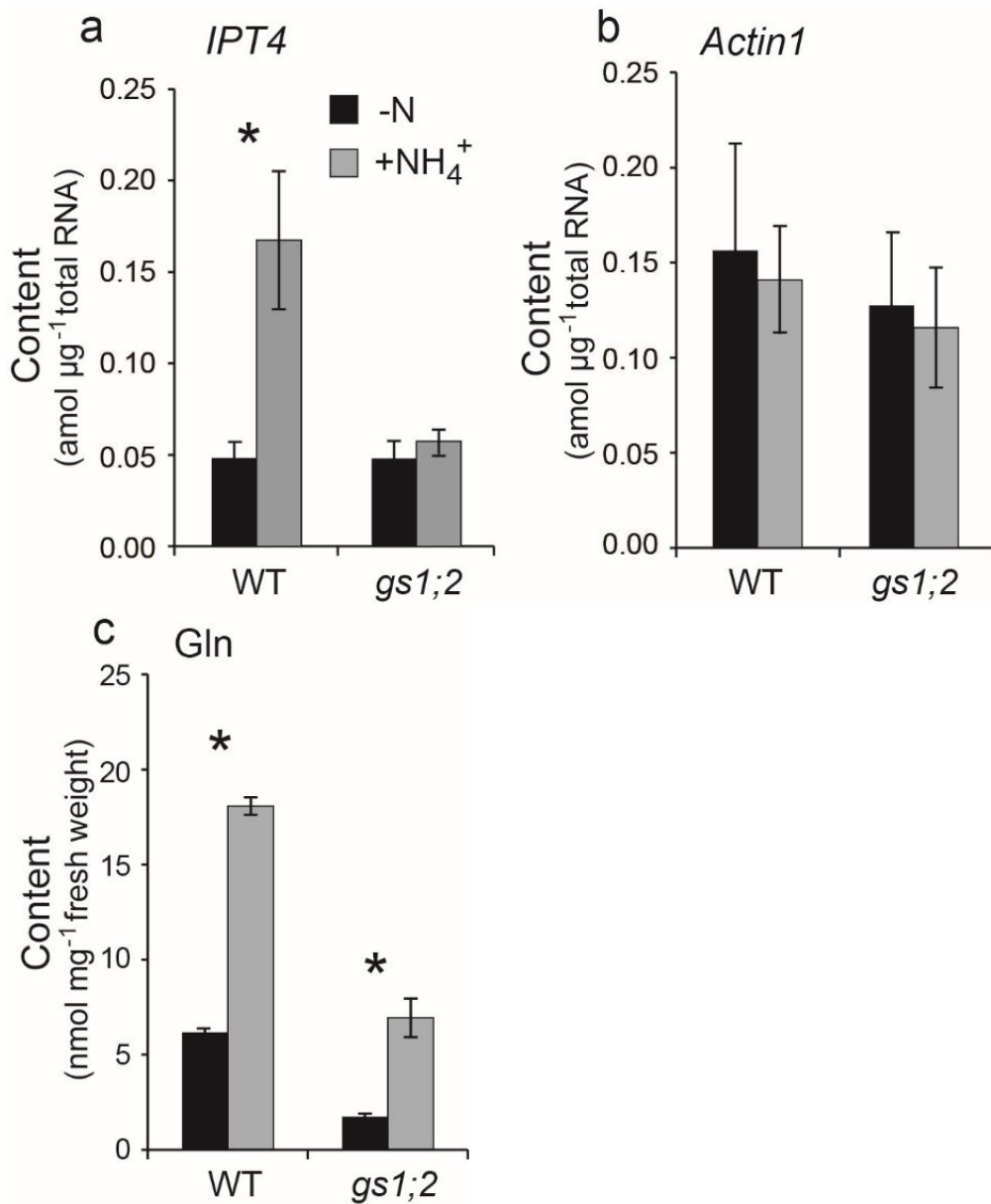


Figure 27. Ammonium-induced accumulation of the glutamine-responsive *OsIPT4* transcript in the shoot basal parts of nitrogen-depleted *gs1;2* mutant (*gs1;2*) and wild-type seedlings (WT). (a, b) Transcript levels of *OsIPT4* (a) and control *actin1* (b) in the shoot basal parts of seventh-leaf stage seedlings grown in water for 3 d followed by treatment with (+NH₄⁺) or without (-N) 1 mM NH₄Cl for 8 h. (c) Gln content of the shoot basal parts of fourth-leaf stage seedlings grown in water for 3 d followed by treatment with or without 1 mM NH₄Cl for 24 h. qPCR analysis (a, b) was carried out as in Fig. 23. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between plants treated with and without 1 mM NH₄Cl (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

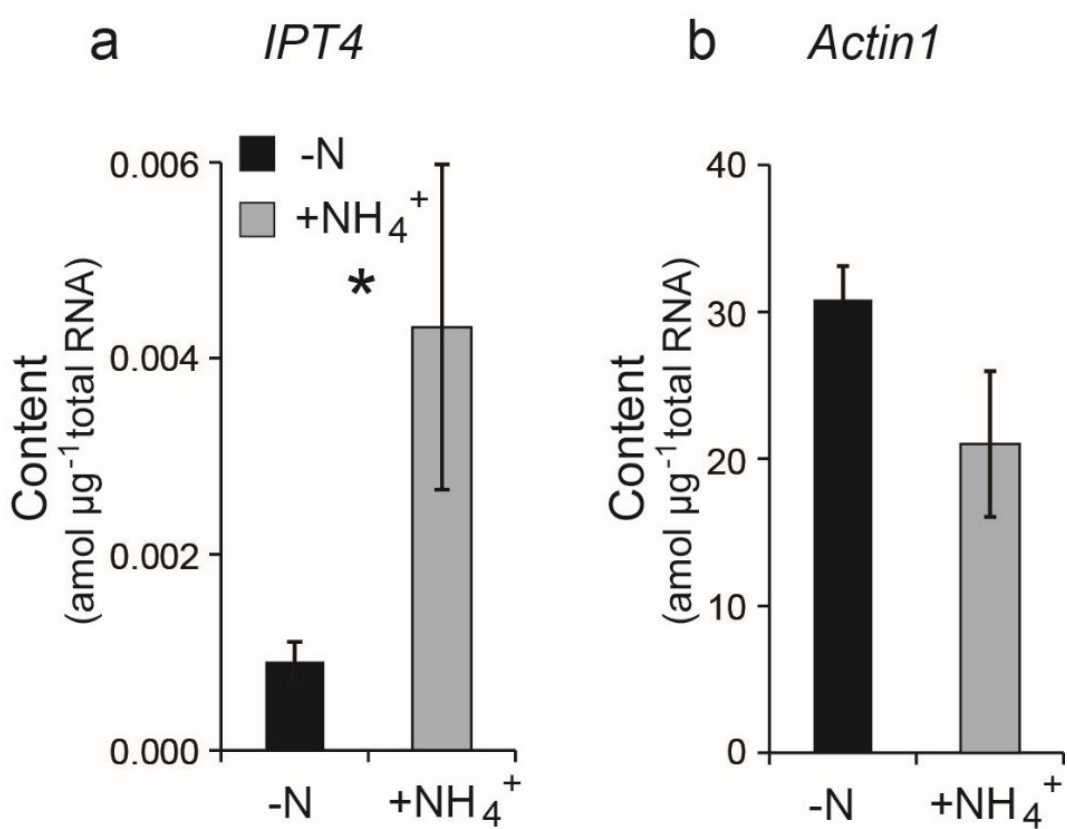


Figure 28. Ammonium-induced accumulation of the Gln-responsive *OsIPT4* transcript in roots of nitrogen-depleted wild-type rice. (a, b) *OsIPT4* transcript levels in roots (a) and control *actin1* (b) transcripts in 18-d nitrogen-depleted seedlings after treatment with or without 1 mM NH₄Cl for 8 h. qPCR analysis (a, b) was carried out as in Fig. 23. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. The asterisk denotes the statistically significant difference between plants treated with and without 1 mM NH₄Cl (* $P < 0.05$ according to the Student's t -test).

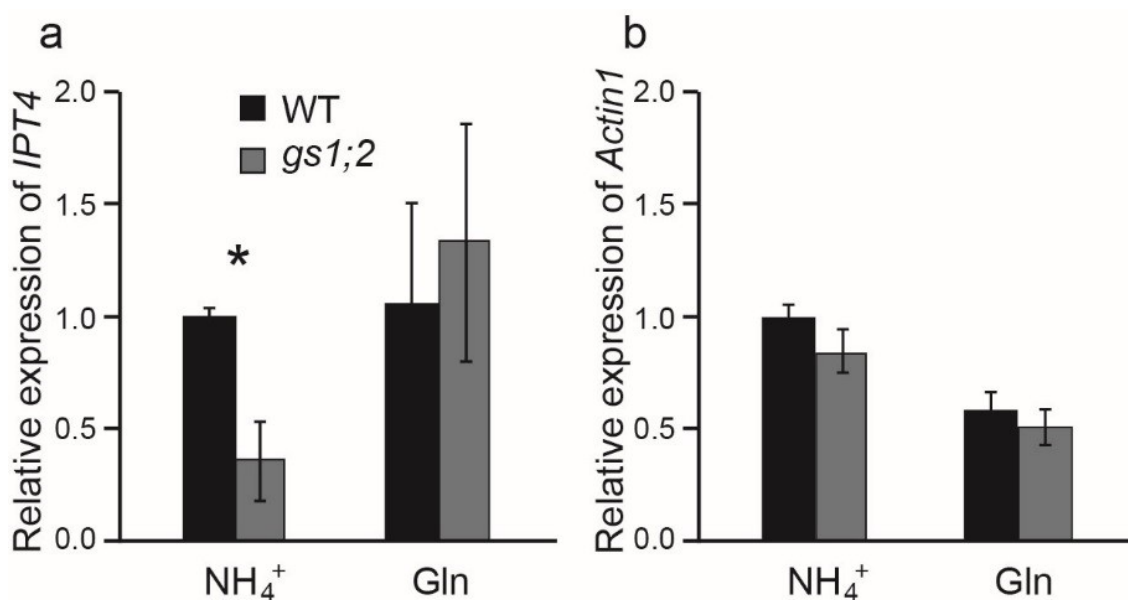


Figure 29. Relative levels of *OsIPT4* expression in the shoot basal parts of the *gs1;2* mutant (*gs1;2*) (gray columns) relative to the shoot basal parts of wild-type rice (WT) (black columns) in response to NH_4^+ and Gln, respectively. (a, b) Relative levels of *OsIPT4* transcripts (a) and control *actin1* transcripts (b). Seedlings were grown hydroponically in the presence of either 1 mM NH_4Cl or 0.5 mM Gln until the 4th-leaf stage. qPCR analysis was carried out as in Fig. 23. Mean values plus the SE of five independent plants are indicated. The asterisk denotes the statistically significant difference between plants treated with NH_4Cl and Gln, respectively (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

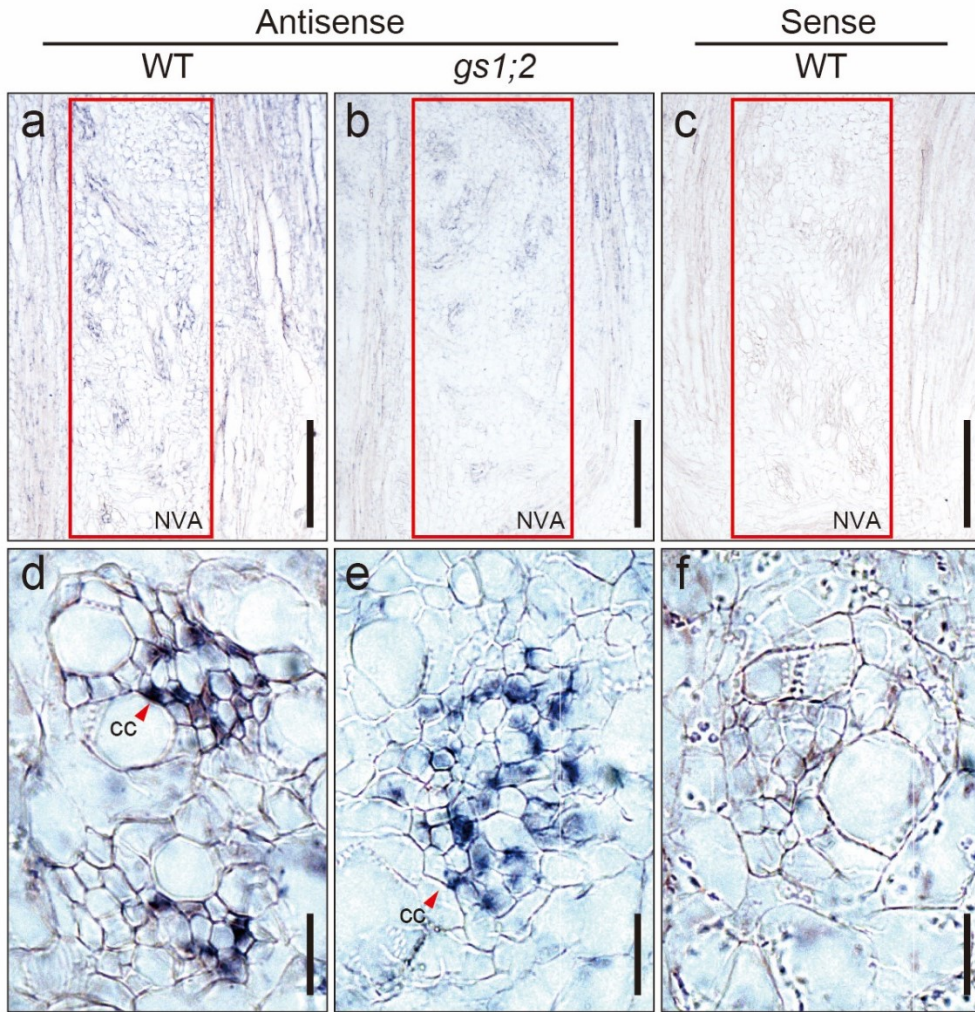


Figure 30. *In situ* localization of the *OsIPT4* transcript in longitudinal sections of shoot basal parts prepared from wild-type (WT) (a, d) and *gs1;2* mutant (b, e) seedlings at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to WT sections (c, f) as a negative control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . NVA, nodal vascular anastomoses of the internode (red boxes in a–c); CC, phloem companion cell. Red arrowheads indicate hybridization signals of the *OsIPT4* transcript in CC (d, e) of NVA (a, b). Note that the signal in the *gs1;2* (b, e) was much weaker than that in the WT (a, d). Scale bars = 200 μm (a–c) and 20 μm (d–f).

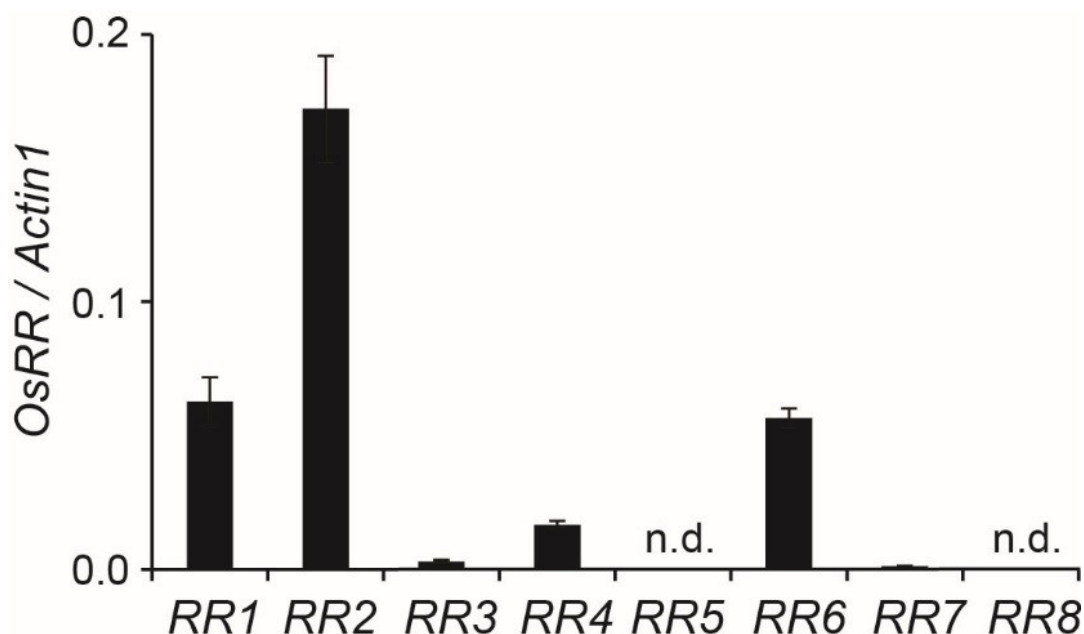


Figure 31. Accumulation of transcripts of cytokinin-inducible type-A response regulator genes (*OsRR1–OsRR8*) in shoot basal parts of wild-type rice seedlings at the 4th-leaf stage. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . qPCR analysis was carried out as in Fig. 23. The expression of each *OsRR* transcript was normalized to that of the *actin1* transcript. Mean values plus the SE of three independent plants are indicated. n.d., not detected.

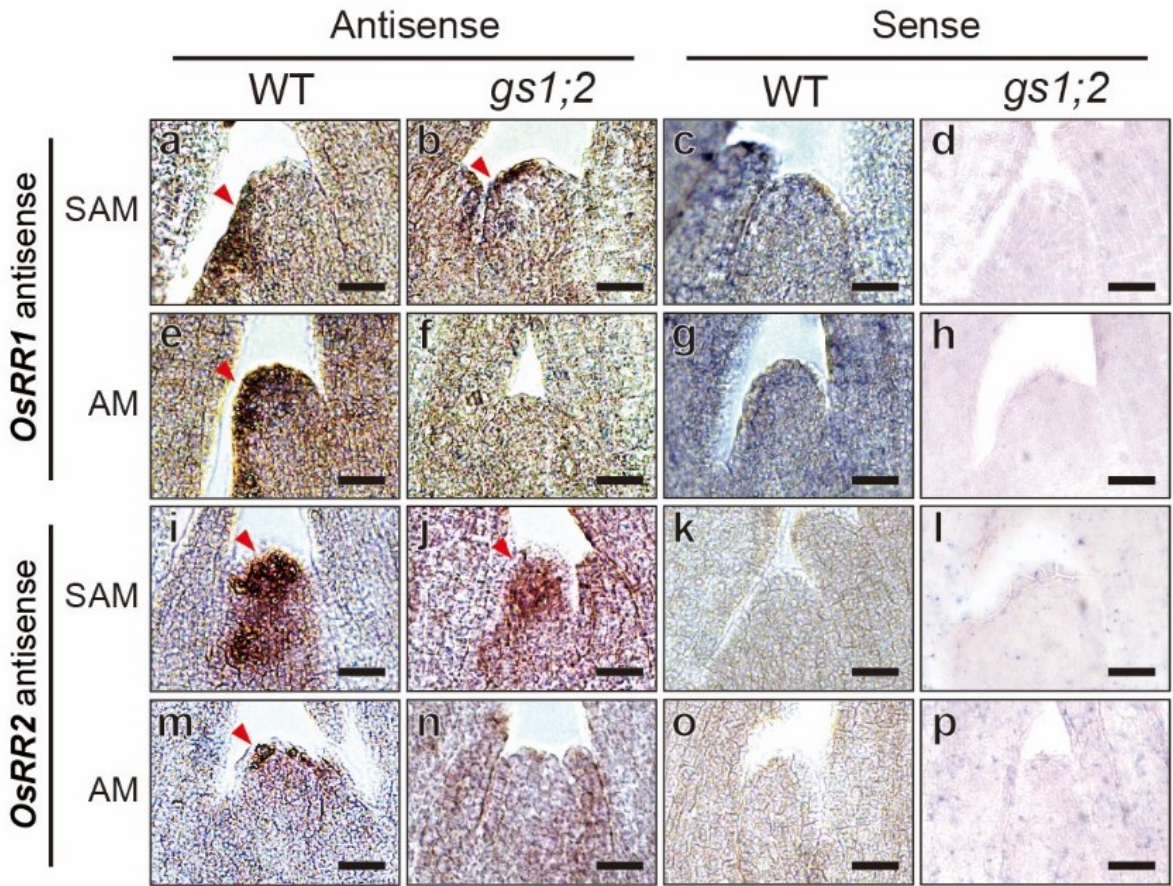


Figure 32. *In situ* localization of transcripts of cytokinin-inducible type-A response regulator genes, *OsRR1* (a, b, e, f) and *OsRR2* (i, j, m, n), in longitudinal sections of the shoot apical meristem (SAM) (a, b, i, j) and axillary bud meristem (AM) (e, f, m, n) prepared from wild-type (WT) (a, e, i, m) and *gs1;2* mutant (b, f, j, n) seedlings at the 4th-leaf stage. Sense probes for *OsRR1* (c, d, g, h) and *OsRR2* (k, l, o, p) were also hybridized to SAM (c, d, k, l) and AM sections (g, h, o, p) of the WT (c, g, k, o) and *gs1;2* (d, h, l, p) as negative controls. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . Red arrowheads indicate hybridization signals of the *OsRR1* and *OsRR2* transcripts, respectively. Note that signals were abolished in the AM of the *gs1;2* mutant (f, n). Scale bars = 50 μm .

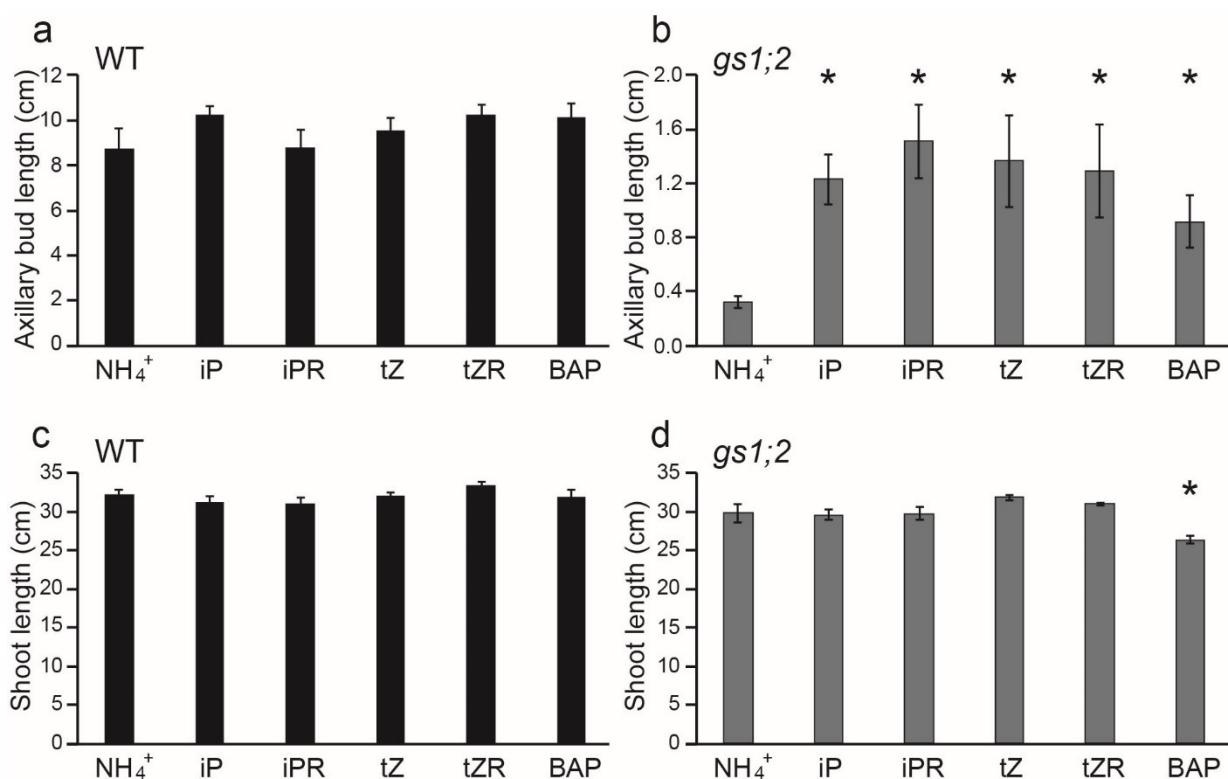


Figure 33. Differences in lengths of axillary buds (a, b) and shoots (c, d) of wild-type (WT) (a, c) and *gs1;2* mutant (*gs1;2*) (b, d) seedlings treated with or without 10 nM free base cytokinin (iP and tZ), precursor cytokinin (iPR and tZR) or synthetic and active cytokinin (6-benzylaminopurine: BAP). Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . Cytokinin treatment of seedling roots was carried out from the 3rd-leaf to the 4th-leaf stage, then the lengths of the axillary buds of the first primary tiller at the axil of the 2nd leaf on the main stem and the lengths of shoots were measured at the 5th-leaf stage. Mean values plus the SE of of five independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between samples treated with and without cytokinins (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

Table 2. Contents of *cis*-zeatin (cZ)-type, dihydrozeatin (DZ)-type, glycosylated cytokinins (CKs), and other classes of phytohormones in the basal parts of shoots, whole shoots, and whole roots of wild-type (WT), *gs1;2* mutant, and *gs1;2/OsGS1;2* complementation line seedlings at the 5th-leaf age.

	shoot basal parts			shoot			root		
	WT	<i>gs1;2</i>	<i>gs1;2/OsGS1;2</i>	WT	<i>gs1;2</i>	<i>gs1;2/OsGS1;2</i>	WT	<i>gs1;2</i>	<i>gs1;2/OsGS1;2</i>
					pmol g ⁻¹ FW				
cZ	1.35 ± 0.57	0.68 ± 0.08	0.62 ± 0.06	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.13 ± 0.00	2.36 ± 0.29	2.78 ± 0.64	2.93 ± 1.13
cZR	2.89 ± 0.26	2.29 ± 0.14	1.96 ± 0.20	1.44 ± 0.26	1.46 ± 0.45	0.75 ± 0.01	6.27 ± 1.85	8.21 ± 2.11	6.74 ± 2.28
cZRPs	0.53 ± 0.11	0.46 ± 0.11	0.52 ± 0.11	0.37 ± 0.10	0.28 ± 0.08	0.20 ± 0.05	2.62 ± 0.60	3.62 ± 1.28	4.36 ± 1.79
DZ	0.12 ± 0.06	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
DZR	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	nd	nd	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
DZRPs	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± -	nd	0.01 ± -
tZ7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
tZ9G	132.30 ± 17.81 a	48.89 ± 3.98 b	63.57 ± 5.62 b	9.84 ± 2.81 a	3.85 ± 0.55 b	8.63 ± 1.23 a	8.20 ± 1.12	7.81 ± 1.61	6.94 ± 0.95
tZOG	0.59 ± 0.11	1.07 ± 0.14	0.99 ± 0.12	0.50 ± 0.12	0.27 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.41 ± 0.04
cZOG	313.47 ± 40.18	397.06 ± 31.14	373.42 ± 21.70	187.75 ± 20.51	210.88 ± 14.48	213.93 ± 10.05	159.36 ± 7.28	169.98 ± 3.24	162.00 ± 17.22
tZROG	0.13 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.26 ± 0.08	0.30 ± 0.06	0.22 ± 0.06
cZROG	52.84 ± 6.21	60.36 ± 4.05	61.84 ± 5.11	22.42 ± 2.51	19.79 ± 1.88	22.65 ± 1.43	70.85 ± 12.81	77.11 ± 3.14	66.83 ± 8.57
tZRPsOG	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.04	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01
cZRPsOG	3.64 ± 0.49	3.55 ± 0.09	3.46 ± 0.19	0.80 ± 0.09	0.65 ± 0.05	0.62 ± 0.05	3.27 ± 0.22	2.96 ± 0.58	3.17 ± 0.47
DZ9G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.04
iP7G	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.02 ± -	nd	nd
iP9G	3.35 ± 0.47	2.38 ± 0.41	2.66 ± 0.31	1.02 ± 0.45	0.46 ± 0.04	0.73 ± 0.11	2.21 ± 0.44	2.52 ± 0.35	2.34 ± 0.25
IAA	147.47 ± 12.50	148.39 ± 3.61	121.87 ± 6.10	39.79 ± 8.28	40.39 ± 5.01	32.20 ± 3.43	144.91 ± 21.51	125.34 ± 30.58	145.57 ± 31.00
IAA-Ala	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IAA-Asp	100.42 ± 9.72	178.52 ± 140.01	98.30 ± 11.76	3.57 ± 0.31	3.89 ± 0.92	3.41 ± 0.59	393.67 ± 25.23	458.91 ± 81.53	482.04 ± 107.87
IAA-Ile + IAA-Leu	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IAA-Phe	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IAA-Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GA1	0.97 ± 0.08	0.66 ± 0.08	1.06 ± 0.09	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GA4	0.98 ± 0.30	2.22 ± 0.53	1.47 ± 0.26	0.98 ± 0.15	1.22 ± 0.40	1.18 ± 0.08	1.19 ± 0.36	0.98 ± 0.28	1.29 ± 0.56
GA7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GA8	0.68 ± 0.15	0.86 ± 0.09	1.06 ± 0.17	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.58 ± 0.11	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.08	0.35 ± 0.04
GA9	5.54 ± 4.81	3.49 ± 1.22	2.64 ± 0.99	1.78 ± 0.68	1.79 ± 0.62	1.63 ± 0.32	nd	nd	nd
GA12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GA19	46.54 ± 12.63	38.95 ± 6.55	39.98 ± 4.28	51.60 ± 5.88	59.79 ± 10.72	34.83 ± 5.22	16.95 ± 2.92 a	8.54 ± 0.30 b	14.76 ± 4.40 a
GA20	1.14 ± 0.20	1.08 ± 0.04	1.23 ± 0.06	0.89 ± 0.36	0.60 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.04
GA24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GA44	13.79 ± 3.89	11.34 ± 0.78	14.35 ± 0.85	3.33 ± 1.30	3.19 ± 0.73	2.43 ± 0.77	0.68 ± 0.08	0.58 ± 0.05	0.68 ± 0.32
GA53	38.35 ± 10.86 a	28.90 ± 4.29 b	43.67 ± 3.24 a	26.29 ± 3.04	24.82 ± 2.57	31.24 ± 2.30	6.95 ± 1.79	5.45 ± 1.84	8.79 ± 4.77
ABA	18.11 ± 4.58	17.92 ± 4.60	13.31 ± 5.21	29.60 ± 5.69	27.97 ± 10.74	22.80 ± 5.16	8.09 ± 1.12	8.34 ± 2.71	8.46 ± 3.12
SA	46.86 ± 10.20 a	85.94 ± 22.54 b	53.59 ± 13.46 a	64.89 ± 7.66	61.97 ± 10.53	59.47 ± 6.11	3.82 ± 1.72	4.81 ± 1.51	2.28 ± 0.38
JA	1.72 ± 0.95	1.59 ± 0.31	0.54 ± 0.28	0.98 ± 0.20	0.62 ± 0.38	0.46 ± 0.47	1.03 ± 0.55	1.91 ± 0.89	1.29 ± 0.60

Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. cZ-type, DZ-type, and glycosylated CKs analyzed included *cis*-zeatin (cZ), cZ riboside (cZR), cZR 5'-phosphates (cZRPs), dihydrozeatin (DZ), DZ riboside (DZR), DZR 5'-phosphates (DZRPs), *trans*-zeatin (tZ)-7-*N*-glucoside (tZ7G), tZ-9-*N*-glucoside (tZ9G), tZ-O-glucoside (tZOG), cZ-O-glucoside (cZOG), tZR-O-glucoside (tZROG), cZR-O-glucoside (cZROG), tZRPs-O-glucoside (tZRPsOG), cZRPs-O-glucoside (cZRPsOG), DZ-9-*N*-glucoside (DZ9G), *N*⁶-(Δ²-isopentenyl)adenine (iP)-7-*N*-glucoside (iP7G), and iP-9-*N*-glucoside (iP9G). Phytohormones analyzed (other than CKs) included auxin [indole-3-acetic acid (IAA) and amide-linked IAA-amino acid conjugates (IAA-Ala, IAA-Asp, IAA-Ile+IAA-Leu, IAA-Phe, and IAA-Trp)], gibberellins (GAs) (GA1, GA4, GA7-GA9, GA12, GA19, GA20, GA24, GA44, GA53), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA). Mean values plus the SE of four independent plants are indicated, except in the case of DZRPs in roots of WT and *gs1;2/OsGS1;2* and iP7G in roots of WT, data for which are comprised of mean values of two independent plants only. n.d., not detected. Statistically significant differences between the WT, *gs1;2*, and *gs1;2/OsGS1;2* are denoted by different letters within each data set ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

第四節 考察

本章の研究では、充足濃度の NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体イネ幼植物における腋芽の伸長阻害と植物ホルモンとの関連性を検討することを目的とした。

植物ホルモンのストリゴラクトンにおける典型的な主成分である *epi*-5DS は、分げつ形成を植物体内で抑制する生理活性を有し、リン栄養欠乏条件下のイネにおいて、*epi*-5DS の高蓄積と分げつ数の減少に正の相関性があると報告された(Umehara et al., 2010)。本研究結果では、GS1;2 欠損変異体イネにおいて、腋芽の伸長抑制が観察された充足窒素濃度の NH_4^+ 供与条件下での根の内生 *epi*-5DS 量は、GS1;2 欠損変異体イネと野生型とで同程度であり、得られた *epi*-5DS の含量は、対照としたリン栄養欠乏処理下の野生型イネの *epi*-5DS 含量と比較して非常に微量であった(Fig. 23)。Umehara ら(2010)が報告した、リン栄養欠乏条件におけるストリゴラクトン蓄積量と分げつ数の減少が高い相関性を示した結果に基づけば、本実験で得られた GS1;2 欠損変異体イネの根のストリゴラクトン含量は、腋芽の伸長を抑制するには、余りにも微量であると判断せざるを得ない。従って、リン栄養欠乏下での現象とは異なり、GS1;2 欠損変異体の分げつ数の減少と内生のストリゴラクトン蓄積量とは関連が非常に低いと考えられる。しかしながら、本研究結果は、イネにおいて、根での NH_4^+ の初期同化が抑制された変異体である GS1;2 欠損変異体(Yamaya and Kusano, 2014)では、ストリゴラクトン非依存的な腋芽の伸長・成長抑制が引き起こされていることを示した。

サイトカイニンは、腋芽の伸長を促進させ、分げつ数を増加させる植物ホルモンであり、その機能は、窒素の利用性と大きく関係する(Sakakibara, 2006; Kamada-Nobusada et al., 2013; Müller et al., 2015)。本研究結果から、充足濃度の NH_4^+ 供給下のイネ幼植物において、GS1;2 が誘導するサイトカイニン合成が、腋芽伸長に必要であり、かつ、グルタミンまたはその関連する代謝産物に依存することを見いだした。

GS1;2 活性の欠損は、 NH_4^+ 供与下で生育したイネ幼植物地上部基部の Gln (第二章, Fig. 22a)および iP 型と tZ 型の前駆体サイトカイニン(iPR と tZR および tZRP; Fig. 24b)の含量の減少を引き起こした。IPT は、iP 型と tZ 型のサイトカイニンの新規合成の初発反応を担う酵素である(Sakakibara, 2006)。OsIPT4 遺伝子は、地上部基部において支配的に発現し(Fig. 25)、かつ、Gln またはその関連する代謝産物により発現誘導されるが(Kamada-Nobusada et al., 2013)、GS1;2 欠損変異体では、節網維管束の節部伴細胞での細胞特異的発現が減少した(Fig. 30a, b, d, e)。野生型では、これらのサイトカイニン前駆体と OsIPT4 mRNA は、根や地上部よりも、地上部基部で多量に蓄積した(Figs. 24, 26)。これらの結果は、エンドウマメにおいて、節における PsIPT1 および PsIPT2 の発現誘導を介した iP 型および tZ 型のサイトカイニンの新規合成が、腋芽の伸長に重要だという報告 (Tanaka et al., 2006)により強く支持される。

イネ幼植物の地上部基部では、*OsGS1;2* は節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞および節と分げつの大維管束組織のような物質転送に重要な組織・細胞群で発現する(第二章, Fig. 8)。節網維管束の篩部伴細胞での、*OsGS1;2* と *OsIPT4* の重複した発現(Figs. 8i, 30a, d)は、この細胞内において、*GS1;2* により合成される Gln が直接的に *OsIPT4* の発現を誘導しえることを示す。他方、他の *GS1* 遺伝子である *OsGS1;1* は、SAM や AM および未成熟葉身のようなシンク組織で主に発現するので、*GS1;1* により合成される Gln の *OsIPT4* 発現への効果は間接的であると推察される。 NH_4^+ 供与下で生育した *GS1;2* 欠損変異体幼植物の節網維管束篩部伴細胞に残存する *OsIPT4* 発現(Fig. 30b, e)は、根から輸送されてきた Gln (Funayama et al., 2013)または地上部基部の *GS1;1* により合成される Gln に応答したと思われる。この残存する *OsIPT4* mRNA の発現レベル(Figs. 25a, 27a)は、窒素涸渇下の野生型の地上部基部の *OsIPT4* mRNA の発現レベル(Fig. 27a)より、わずかに高いにすぎない。これらの知見は、節網維管束の篩部伴細胞での *OsIPT4* の十分な発現には、同じ細胞、および、多分、隣接する柔細胞と根の組織での、*GS1;2* を介した Gln 合成が必要であることを示唆する。リグニン生合成の初期過程での PAL 反応により生じる NH_4^+ (Sakurai et al., 2001)や根から地上部へ輸送される NH_4^+ (Funayama et al., 2013)が、地上部基部の *GS1;2* に供給されて Gln 合成に利用されるのかもしれない。

GS1;2 欠損変異体の節網維管束の篩部伴細胞特異的な *OsIPT4* 発現の顕著な減少(Fig. 30b, e)は、Gln またはその関連する代謝産物に依存した iP 型と tZ 型のサイトカイニンの新規生合成の初期反応がこの細胞で減少していることを示唆した。第二章でも議論したが、節網維管束の篩部伴細胞は、分げつへの同化産物や水栄養分の転送調節に重要である。しかしながら、*GS1;2* 欠損変異体での AM 上部細胞群における活性型サイトカイニン誘導性の *OsRR1* と *OsRR2* の発現消失(Fig. 32f, n)と根へのサイトカイニン外部供給による腋芽伸長の部分的な回復(Fig. 33b)は、腋芽伸長の促進に必要なサイトカイニンの局所的活性化が *GS1;2* 欠損変異体の AM では、生じていないことを示唆する。イネでは、サイトカイニン活性化酵素 LOG の遺伝子が、AM の限定的な上部細胞群で発現し(Kurakawa et al., 2007)、また、*OsIPT* 遺伝子とは異なり、明確な窒素応答的発現を示さない(Ding et al., 2014)。これらの知見は、*GS1;2* 欠損変異体における節網維管束の篩部伴細胞でのサイトカイニン生合成の低下が、おそらく、AM での LOG が関与する活性化反応に必要なサイトカイニン前駆体の篩管への積み込みと輸送の低下を引き起こしていることを示唆する。従って、*GS1;2* は、イネ幼植物における腋芽伸長に必要でありかつ Gln やその関連する代謝産物に依存したサイトカイニンの生合成に寄与する。付け加えるに、*GS1;2* 欠損変異体における、外部サイトカイニン添加に対する他の葉の腋芽の応答や長期的なサイトカイニン処理の腋芽伸長への効果は検討していないが、サイトカイニン添加により、腋芽伸長が部分的にしか回復しなかった結果(Fig. 33b)は、腋芽への窒素分配が不十分であることに大きく起因すると思われる。この事は、*GS1;2* 欠損変異体における、 NH_4^+ を Gln へ同化する反応が傷害を受けた結果としての窒素同化産物の利用性の低下(第二章, Fig. 22a-c)によると考えられる。

極最近、Kan ら(2015)は、野生型イネ幼植物の正常な生育には、単独の窒素源として 0.5 mM の Gln の供与が十分であり、1 mM 以上の濃度の Gln の供与は生育を阻害することを報告した。それゆえ、本章の研究でも、GS1;2 欠損変異体と野生型における、4 葉齢期での地上部基部での *OsIPT4* 発現と 5 葉齢期での腋芽伸長への 0.5 mM Gln の外部添加の効果を検討した。その結果、野生型と GS1;2 欠損変異体の幼植物は、地上部基部の *OsIPT4* の同等な発現レベルを示した(Fig. 29a)。しかしながら、0.5 mM Gln 供与は、地上部生育は正常であるにもかかわらず、両幼植物の腋芽伸長を阻害する結果となった(データ未掲載)。この事は、0.5 mM Gln 供与では、腋芽への窒素分配が、正常な成長には不十分であることを示唆した。このため、Gln の外部供給が、GS1;2 欠損変異体の腋芽の伸長を正常なレベルまで回復するか否かを確認することはできなかった。

また、サイトカイニン、形成された腋芽の伸長と同様に、正常な AM の形成にも必要である(Müller et al., 2015)。GS1;2 欠損変異体の AM それ自体が、その発生の途絶により、ある程度形成不全となっている可能性も否定はできない。オーキシンの極性移動を欠失させる茎頂部の切除試験(Domagalska and Leyser, 2011; Müller et al., 2015)は、この可能性の検証に有効であるかもしれない。しかし、NH₄⁺供与した GS1;2 欠損変異体が腋芽伸長抑制と分げつ数減少を示す栄養成長期では、イネの節間伸長は抑制されているため、この生育ステージでの茎頂部の切除試験は困難である(Arite et al., 2007)。

NH₄⁺供与下で生育した GS1;2 欠損変異体と野生型の幼植物間では、根の iP 型と tZ 型のサイトカイニン含量や地上部の iP 型サイトカイニンと tZ の含量に有意な差は見られなかった(Fig. 24b)。 *OsIPT4* は、根の維管束組織で高発現し、葉の節部での発現レベルは低い(Kamada-Nobusada et al., 2013)。NH₄⁺供与下の GS1;2 欠損変異体において、根と導管液の Gln の減少(Funayama et al., 2013)が、根と地上部での *OsIPT4* の発現に影響している可能性が考えられる。しかしながら、Kamada-Nobusada ら(2013)は、 *OsIPT4* の発現抑制が、導管を介した根から地上部へのサイトカイニンの移行には影響を与えるが、イネ幼植物の根と地上部のサイトカイニン含量には影響を与えないことを報告した。同研究者らは、局所的なサイトカイニン濃度の違いを全器官レベルで隠してしまう、サイトカイニン代謝の恒常的調節を提唱した。従って、GS1;2 欠損変異体の根や地上部でも、同様な様式のサイトカイニンの代謝制御が生じているのかもしれない。付け加えるに、最近の野生型シロイヌナズナと、*AtIPT3* と *AtIPT5* および *AtIPT7* の三重変異体(*ipt3,5,7*)の間での接ぎ木実験では、根由来のサイトカイニンも腋芽の伸長に影響することが示された(Müller et al., 2015)。従って、NH₄⁺供与下の GS1;2 欠損変異体の地上部基部での iP 型と tZ 型のサイトカイニン前駆体の含量減少は、おそらく、部分的には根でのサイトカイニン合成低下にも起因すると考えられる。

NH₄⁺供与下で生育した *OsIPT4* 発現抑制イネ組換え体では、栄養成長期初期でのみ、地上部生育の遅延を生じた(Kamada-Nobusada et al., 2013)。対照的に、NH₄⁺供与下で生育した GS1;2 欠損変異体幼植物では腋芽の伸長抑制と分げつ数の減少が生じた(第二章, Figs

2, 3)。また、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体では、栄養成長期での地上部長の減少と生殖成長期での穂の付いた有効分げつ数の減少を示した(Funayama et al., 2013)。この表現型は、サイトカイニン以外の要因が NH_4^+ 供与下の GS1;2 欠損変異体の腋芽伸長抑制に関与していることを示唆する。第二章の研究で明らかとしたように、 NH_4^+ 供与下で生育した GS1;2 欠損変異体幼植物の地上部基部では、窒素と炭素の代謝が大きく変化していた。窒素代謝と炭素代謝およびこれらの代謝産物の利用性の更なる解析が、分げつ発達における GS1;2 の生理学的機能のより深い理解のためには必要と考える。

第四章 GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での窒素代謝との関連性の解析

第一節 緒言

GS1;2 欠損変異体では、腋芽の伸長抑制に起因して、分げつ数が減少する。腋芽の伸長の制御には複数の要因が複雑に影響しており、その制御に関わる内的要因として、代謝産物の利用効率と植物ホルモンのシグナル伝達ネットワークが考えられている(Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012; Domagalska and Leyser, 2011)。第三章の研究では、 NH_4^+ 供与下の GS1;2 欠損変異体幼植物の腋芽伸長抑制の一因は、地上部基部の維管束組織での GS1;2 欠損による Gln 含量減少が、Gln 応答性のサイトカイニン前駆体合成低下を引き起こし、結果として AM の活性型サイトカイニンが不足することであることを明らかにした。

第二章の研究により、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、Gln 量だけでなく Asn 量が顕著に減少した(Fig. 22a, b)。Gln と Asn は、様々な植物における主な体内長距離輸送形態窒素であり、植物の成長や発達に重要な役割を担う(Urquhart and Joy, 1981; Ireland and Lea, 1999; Lea et al., 2007; Gaufichon et al., 2010)。イネでは、Gln と Asn は、篩管液(Hayashi and Chino, 1990)や導管液(Fukumorita and Chino, 1982; Funayama et al., 2013)だけでなく、 NH_4^+ 供与後の幼植物の根(Funayama et al., 2013)においても、主要な遊離アミノ酸である。イネ根に吸収された NH_4^+ は、根において GS 1;2/ NADH-GOGAT1 サイクルにより速やかに Gln や Glu へ初期同化され、同化窒素は、主に Gln や Asn の形で導管を通じて地上部へ輸送される(Tobin and Yamaya, 2001; Yamaya and Kusano, 2014)。Asn は、Gln と比較して、化学的安定性に富み、かつ、高い窒素/炭素比のため、新規タンパク質の合成や貯蔵において重要であると考えられている。

植物における Asn の生合成経路は、主に 3 つの経路が考えられている。アスパラギン-オキソ酸アミノ基転移酵素(EC 2.6.1.14)により 2-オキソスクシナミン酸から生合成される経路と、3-シアノアラニン合成酵素(EC 4.4.1.9)や 3-シアノアラニン加水分解酵素(EC 4.2.1.65)によりシステインから合成される経路、および、アスパラギン合成酵素(AS, ASN; EC 6.3.5.4)により、アスパラギン酸(Asp)から合成される経路である。アスパラギン-オキソ酸アミノ基転移酵素反応は可逆反応であるが、2-オキソスクシナミン酸を基質とした反応は、Asn を基質とした反応よりも活性が 1/20 と非常に低く、植物体内での生理的重要性は低いと考えられている(Sieciechowicz et al., 1988)。3-シアノアラニン合成酵素と 3-シアノアラニン加水分解酵素による Asn の合成経路ではシアンが必要であるが、植物の主なシアン源のシアン配糖体は植物の極限られた部位にしか存在しないため、この経路は Asn 合成の主経路になりえないと考えられている(Sieciechowicz et al., 1988)。

一方、AS は、以下の Asn 合成反応を触媒する(Lea et al., 2007; Gaufichon et al., 2010)。



AS をコードする小遺伝子ファミリーが多く、植物で見つかり、近年の系統発生的な解析により、植物 AS 小遺伝子ファミリーは、クラス 1 とクラス 2 の 2 つのサブグループ内で単子葉と双子葉の各 AS のグループに分類されることが判明した(Gaufichon et al., 2010)。本研究では、イネゲノムにコードされている、クラス 1 に属する AS (CI197925: Os03g0291500)を OsAS1、クラス 2 に属する AS (D83378: Os06g0265000)を OsAS2 と名付けた。

様々な植物において、AS 遺伝子は、光照射条件やストレス条件および収穫後の老化などに依存して発現変動することが示されている(Tsai and Coruzzi, 1990; 1991; Davis and King, 1993; Lam et al., 1994; 1998; Chevalier et al., 1996)。Gaufichon ら(2010)は、シロイヌナズナにおける AS (ASN)の各分子種ごとの発現特性や推定生理機能を総括した。シロイヌナズナの AS は、クラス I に属する AtASN1 およびクラス 2 に属する AtASN2 と AtASN3 から成る。AtASN1 と AtASN2 の各遺伝子は、成長過程でそれぞれ異なった発現プロファイルを示し、また、*in silico* の発現データ解析から、AtASN1 が種子の発芽の際の窒素転送および老化葉や種子登熟における窒素転流に関わる可能性が示唆され、一方、AtASN2 が、栄養成長期におけるストレス条件下での窒素リサイクルに関わる可能性が示唆された。また、AtASN2 mRNA は、栄養成長期のシロイヌナズナ葉身の篩部伴細胞に蓄積し、かつ、AtASN2 欠損シロイヌナズナ変異体の篩管液では、Asn 含量が著減したことから、AtASN2 が葉からの窒素の転流に重要であることが示唆された(Gaufichon et al., 2013)。転流 Asn は、おそらくアスパラギナーゼによって Asp に変換されてから利用されると考えられている(Credali et al., 2013)。また、ヒマワリでは、AS イソ酵素遺伝子(*HAS1* と *HAS1.L*)が、窒素源に依存して発現すること(Herrera-Rodríguez et al., 2002; 2004; 2006)、シロイヌナズナでは、光照射下で NH₄⁺供与すると ASN2 mRNA が発現蓄積すること(Wong et al., 2004)など、AS 遺伝子の窒素に応答した発現誘導も報告されている。さらに、当研究室におけるイネの地上部の免疫染色解析では、イネ AS タンパク質が、葉鞘の篩部伴細胞に分布することが判明した(Nakano et al., 2000)。

このように、植物体地上部での AS の生理的機能については解析が進められてきたが、根における AS の生理的機能に関する知見は極めて乏しい。イネ根では、NH₄⁺供与後に AS のタンパク質含量と活性が増加することが報告されている(Kawachi et al., 2002)。この AS タンパク質含量増加は、GS の活性阻害剤である MSX の添加処理で、完全に阻害されることから、AS タンパク質の合成には Gln の存在が必要なが示唆された。しかし、上記の Nakano ら(2000)や Kawachi ら(2002)によるイネにおける AS の研究は、イネに AS が 2 分子種存在することが明らかになる以前に行われたために、これらの研究では、OsAS の 2 分子種は区別されていなかった。また、イネの節や腋芽を含む地上部基部における AS の研究も皆無である。

そこで、本章の研究では、GS1;2 欠損による分げつ数減少と Asn 代謝の変化の関連性の解明を目的とした。OsAS の 2 分子種の窒素応答性を含めた遺伝子発現特性や組織・細胞分布ならびに個別機能に関する知見がなかったため、まず、イネにおける *OsAS1* と *OsAS2* の各 AS 遺伝子の時空間的発現特性の比較解析および *AS1* 遺伝子破壊イネ変異体系統を用いた逆遺伝学的な解析により、AS1 のイネ根における生理学的機能を明らかにした。その上で、NH₄⁺供給下の GS1;2 欠損変異体イネの地上部基部を用いて、各 AS 遺伝子の組織・細胞レベルでの発現や Asn 代謝の変化を詳細に解析するとともに、*AS1* 遺伝子破壊イネ変異体系統の分げつ数の変化を解析した。

第二節 材料と方法

(1) 植物材料

イネの GS1;2 遺伝子の第 2 エキソンに *Tos17* が挿入された GS1;2 欠損変異体イネ系統 [NF6488(-/-): *gs1;2*] および遺伝背景の日本型イネ栽培品種日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) (野生型: WT)、ならびに、下記の(2)の方法で獲得した *Tos17* 挿入による AS1 欠損変異体イネ系統 [NF7811(-/-): *as1-m1*, NF4467(-/-): *as1-m2*] を用いた。

(2) AS1 欠損変異体イネ系統の獲得

独立行政法人農業生物資源研究所より、*Tos17* が *OsAS1* 遺伝子上に挿入されて *OsAS1* 遺伝子が欠損している可能性がある候補系統イネの 2 系統 (NF7811 および NF4467: mutant panel: <https://tos.nias.affrc.go.jp/~miyao/pub/-tos17/>) の F1 種子を、それぞれ 20 粒ずつ分譲していただいた。AS1 欠損変異体イネの単離のために、これらの発芽した種子を pH 5.5 に調整した 1/4 強度の水耕液へ移植し、P1P 温室にて水耕栽培を行った。2 週間後、両候補系統イネ幼植物の葉からゲノム DNA を抽出し、*OsAS1* 遺伝子および *Tos17* に特異的な primer を用いた PCR およびシーケンス解析によって、*Tos17* の *OsAS1* 遺伝子上の挿入位置を特定した。さらに、*Tos17* が *OsAS1* 遺伝子の対立遺伝子上にホモで挿入されている個体を両候補系統より PCR 法を用いて選抜し、それぞれ *as1-m1* および *as1-m2* と名付けた。選抜された *as1-m1* および *as1-m2* を土耕栽培へと移し、種子が得られるまで栽培した。

(3) 栽培条件

第二章第二節(2)と同様に、各系統の種子を塩水選後発芽させ、これらの幼植物を、発芽後から本学本農学研究科実験圃場の P1P 閉鎖系温室(26℃、5:30 から 18:30 まで補助光を点灯)にて、水耕栽培した。

野生型の根と地上部における *OsAS1* および *OsAS2* の発現の定量には、5 mM MES-NaOH (pH 5.5) を用いて pH 5.5 に調整した水道水を用いて 18 日間栽培し、各器官に分けて収穫して、解析に用いた。

NH₄⁺ 供与後の AS mRNA の発現変化を定量した実験では、5 mM MES-NaOH (pH 5.5) を用いて pH 5.5 に調整した水道水に対して、窒素源非添加[無窒素区(-N)]または 1 mM NH₄Cl 添加 [NH₄⁺ 供与区(+N)] し、播種後 18 日経過した幼植物を各処理区に移植した。移植は午前 10 時に行い、移植後、4、8、24、48、72 時間後にそれぞれ根をサンプリングした。

根における各 AS 遺伝子発現の組織・細胞特異性を *in situ* hybridization 法解析した植物は、窒素源として 1 mM NH₄Cl を含む 1 強度の水耕液(Mae and Ohira, 1981)を用いて、7

葉齢まで栽培した植物を、水道水に移植し、3日間無窒素処理をした後、上記と同様に無窒素区(-N)または1 mM NH₄⁺供与区(+N)に移植した。その後、植物を移植して8時間後に、根の先端(約5 mm)を収穫した。

AS1 欠損変異体系統および野生型の根における *OsAS1* の発現定量実験、根や導管液のアミノ酸の測定、および全窒素量や全炭素量の測定は、発芽後18日間水道水で栽培し、上記と同様に無窒素区(-N)または1 mM NH₄⁺供与区(+N)に移植して栽培後、収穫した。

野生型と GS1;2 欠損変異体の地上部基部における各 *AS* の遺伝子発現と、その発現の組織・細胞特異性の *in situ* hybridization 法解析では、1 mM NH₄Cl を含む1強度水耕液を毎週交換して、4葉齢期まで栽培を行った。

短時間の NH₄⁺供与後の地上部基部における遺伝子発現解析とアミノ酸の定量には、上記と同様に水耕栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体を、水のみにて3日間栽培して窒素枯渇処理を行った後、1 mM NH₄Cl 処理または無窒素処理した。この遺伝子発現解析では、7葉齢期の幼植物を8時間1 mM NH₄Cl 処理または無窒素処理した。また、アミノ酸定量では、4葉齢期の幼植物を24時間1 mM NH₄Cl 処理または無窒素処理した。

GS 活性の阻害剤である MSX を用いた、野生型の地上部基部における Gln 応答性遺伝子発現の解析では、まず、1 mM NH₄Cl を含む1強度水耕液を毎週交換して、3葉齢期まで栽培を行い、水道水にて窒素枯渇処理を3日間行った。その後、1 mM MSX で2時間前処理を行なった。MSX で前処理した幼植物は、1 mM NH₄⁺で8時間処理した。また、MSX 非前処理の幼植物は、水道水、1 mM NH₄⁺または5 mM Gln にて8時間処理を行った。

野生型と AS1 欠損変異体系統の地上部基部におけるアミノ酸量の解析では、1 mM NH₄Cl を含む1強度水耕液を毎週交換して、4葉齢期まで栽培を行った。

分けつ数と葉齢の経時的な測定では、第二章第二節(2)と同様に、発芽後、20日間、1 mM あるいは2 mM NH₄Cl を含む1強度水耕液で水耕栽培し、その後、4 L ワグネルポット内にバーミキュライトを満たしたものに移植した。移植は、1 ワグネルポットにつき2個体とし、6 ワグネルポットを1つのバット(容量12 L, 27 cm×47 cm×21 cm; Thanko Co. Ltd., Tokyo, Japan)内で、引き続き、1 mM あるいは2 mM NH₄Cl を含む1強度水耕液を用いて、栽培を行った。水耕液の交換は、週一回の間隔で行った。但し、水耕液交換前に水耕液が減り、イネの地上部基部が露出するような時は、水道水を追加した。

(4) *OsAS1* および *OsAS2* の cDNA のクローニング

OsAS1 (Os03g0291500: RAP-DB, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>) または *OsAS2* (Os06g0265000) の遺伝子配列に特異的な primer [本章本節(9)]を用いた RT-PCR により、*OsAS1* および *OsAS2* の cDNA を獲得した。RT-PCR の鋳型となる一本鎖 cDNA は、

total RNA を RNeasy plant kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて抽出後、得られた RNA を PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO INC., Siga, Japan)により逆転写して獲得した。ついで、PCR 反応は、KOD Fx NEO DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて行った。得られた PCR 産物を pCR-BluntII-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)へとクローニングし、insert cDNA の全長配列を DNA シーケンス解析(Takara 社受託解析)にて確認した。

(5) 定量的リアルタイム PCR

OsAS1、*OsAS2* および *actin1* の各 mRNA の qPCR 解析には、*OsAS1*、*OsAS2* または *actin1* (accession No. KC140126)の遺伝子配列に特異的な primer [本章本節(9)]を用いた。qPCR には Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用い、95°C 10 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒と 60°C 34 秒を 50 サイクルの条件下で PCR 反応を行った。また、mRNA 量を定量するにあたり、*OsAS1*、*OsAS2* または *actin1* の cDNA クローンをスタンダードとして用いて定量を行った。

(6) *in situ* hybridization 法を用いた *OsAS1* または *OsAS2* の各 mRNA の細胞分布解析

in situ hybridization 法解析は、第二章第二節(6)と同様に行った。

OsAS1 または *OsAS2* の各遺伝子 cDNA の 3'側非翻訳領域の 200 bp の DNA 断片を、特異的な primer [本章本節(9)]による RT-PCR を用いて増幅し、pCR-4Blunt-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)にクローニングして、RNA プローブの鋳型とした。これらの各鋳型プラスミドを *Not* I で処理後、T3 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、DIG 標識 antisense 鎖 RNA probe を作成した。また、同様に、各鋳型プラスミドを *Pst* I で処理し、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、コントロールの DIG 標識 sense 鎖 RNA probe を作成した。これらの操作には DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用いた。

イネの地上部基部および根の先端 (根の先端より約 5 mm の領域)をカミソリ (FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)にて切り出した。切り出したサンプルは、第二章第二節(6)と同様に各処理を行い、*in situ* hybridization 法解析した。

(7) イネの根と地上部基部および導管液中の遊離アミノ酸の定量

-80°Cで凍結保存していたイネの根あるいは地上部基部を、ジルコニアビーズ (AS One Corporation, Osaka, Japan)およびマルチビーズショッカー (MB601U, YASUI KIKAI Co., Ltd., Osaka, Japan.)を用いて粉砕した。粉砕後、試料に、新鮮重の 5 倍容の 10 mM HCl を添加し、再びマルチビーズショッカーを用いて混和した後、15,000 rpm 15 分間遠心分離した。上清をフィルターカップ (Ultra free-MC 5000 NWWL Filter Unit; Merck Millipore

Corporation, Darmstadt, Germany)へと移し、さらに 15,000 rpm 15 分間遠心分離処理した。この溶出液をイネの根あるいは地上部基部のアミノ酸抽出液とした。

導管液は、次のように採取した。野生型および AS1 欠損変異体 2 系統を、発芽後 18 日間水道水で栽培後、1 mM NH₄Cl を含む水道水へと移植し、24 時間の NH₄⁺供与(+N)処理を行った。また、窒素源非添加(-N)処理も行った。そして、処理後、水耕液に浸したまま、カミソリを用いて、地上部と根との境目より約 5 mm 上の部分で地上部を切り落とした。そして、その後、2 時間以内に滲出してきた液を集め、導管液とした。ただし、窒素源非添加(-N)処理では、導管液は滲出せず、導管液は得られなかった。

得られたイネの根と地上部基部のアミノ酸抽出液および導管液は、第二章第二節(11)と同様に、AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit (Waters Corporation, Massachusetts, USA)と ACQUITY UPLC H-Class システム (Nihon Waters K. K., Tokyo, Japan)を用いて、NH₄⁺とアミノ酸の誘導体化、分離および定量を行った。

(8) 全窒素量および全炭素量の測定

野生型イネおよび AS1 欠損変異体 2 系統を、発芽後 18 日間水道水で栽培した後、本章本節(3)と同様に、窒素源非添加[無窒素区(-N)]または 1 mM NH₄Cl 添加 [NH₄⁺供与区(+N)]処理した。その後、地上部と根に切り分けて、80℃にした通風乾燥機にて 1 週間かけて完全に乾燥させた。測定は、第二章第二節(5)と同様に操作した。

(9) primer の塩基配列情報

本章の研究で用いた遺伝子特異的プライマーの塩基配列を以下に示した。

Purpose	Gene	Name	Sequence
AS cDNAクローンの獲得	OsAS1	OsAS1-F	5'- CCTCGCCGTTAGTTCACCACCGGGCGCCACCATG -3'
		OsAS1-R	5'- ATCAATGGCCGTCCGGCCGGCCAGCTTCGAGCGTTA -3'
	OsAS2	OsAS2-F	5'- GGGAGGGCACCATGTGTGGCATCCTCGCCGTGCTC -3'
		OsAS2-R	5'- ACAAACTACGGAGTTTTATGCGACGATAGAAAGTTA -3'
	OsAS1	OsAS1-F	5'- TCGCAGGCGAAGAGGGCTCACGTCCCTC -3'
		OsAS1-R	5'- AGCGGGGAGACGATGGCGAGACGCTGC -3'
リアルタイムPCRに用いたprimer	OsAS2	OsAS2-F	5'- TCCCTCGCCAAGCGCTCCCGCATCATC -3'
		OsAS2-R	5'- TGGGATCAACAATAGCCAACCGCTGGT -3'
	Actin1	OsActin_F	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA -3'
		OsActin_R	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA -3'
	OsGS1;1	OsGS1-1 real 04	5'- CAAGTCTTTTGGGCGTGATATTGTTGAC -3'
		OsGS1-1 real 05	5'- CACCTGATCACCGGCAGAAATGCCGACA -3'
	OsGS1;2	OsGS1-2 real 04	5'- AAAGGCGTTCGGCCGCGACATCGTGGAC -3'
		OsGS1-2 real 05	5'- CACTTGGTCAGCAGCGCGCATGCCAACT -3'
	OsNADH-GOGAT1	OsGlt1 F	5'- GTGCAGCCTGTTGCAGCATAAA -3'
		OsGlt1 R	5'- CGGCATTTACCATGCAAATC -3'

Purpose	Gene	Name	Sequence
<i>in situ</i> hybridizationのプロープに用いたコンストラクトの作成	OsAS1	OsAS1_3'UTR_F	5'- CGCTCGAAGCTGGCCGGCCGGACGGCCATTGATCG -3'
		OsAS1_3'UTR_R	5'- ACAGAACGCGCCAACGTCATGGGCGATTGGTGAGA -3'
	OsAS2	OsAS2_3'UTR_F	5'- CTTTCTATCGTCGCATAAACTCCGTAGTTTGTG -3'
		OsAS2_3'UTR_R	5'- ATGTTCTGATCAGTCCACGACCAACAGTTTGCAT -3'
AS1欠損変異体の単離	OsAS1	OsAS1 KO m1_F	5'- CCTCGCCGTTAGTTCCACCACCGGGCGCCACCATG -3'
		OsAS1 KO m1_R	5'- ATCAATGGCCGTCCGGCCGGCCAGCTTCGAGCGTTA -3'
	OsAS1	OsAS1 KO m2_F	5'- ATCGTCTCCCCGCTCTCCGGCGACCAGCCGCTGTA -3'
		OsAS1 KO m2_R	5'- GCGGGATGATGACCTCGCAGTCGCTGCCGGTGCTG -3'
	Tos17	Tos17-Left_01	5'- ATTGTTAGGTTGCAAGTTAGTTAAGA -3'
		Tos17-Right_01	5'- GACAACACCGGAGCTATACAAATCG -3'

(10) 分げつ数の測定と栽培方法

AS1 欠損変異体の分げつ数の経時的な測定は、バーミキュライトに移植後、1 mM あるいは 2 mM NH₄Cl を含む 1 強度水耕液で栽培し、第二章第二節(3)と同様に測定した。このとき、葉齢もコントロールとして測定した。

また、東京大学大学院農学生命科学研究科 佐々木 和浩博士との共同研究により、2015 年度の 5 月から 10 月にかけて、以下の通りに東京大学大学院農学生命科学研究科附属 田無演習林の水田で栽培し、分げつ数を測定した。

発芽した種子を育苗箱へと播種し、田無演習林の温室の自然光条件下にて、4 週間栽培した。その後、田無演習林の水田に、移植した。1 列に 18 cm 間隔で 8 個体を植え、それを 30 cm 間隔で 4 列並べて、1 プロットとした。各系統、4 プロットずつ植えた。移植前に元肥として、N、P₂O₅ および K₂O を、それぞれ 24、36 あるいは 32 kg ha⁻¹ 施肥した。出穂前の 7 月末に、分げつ数、草丈ならびに最上位展開葉におけるクロロフィル含量指標の SPAD 値を測定した。分げつ数、草丈および SPAD 値を測定したサンプルには、各プロットの 3 あるいは 4 列目で、成長が揃っている列の 2 個体目から 7 個体目のうち、5 個体を用いた。

第三節 結果

(1) OsAS1 および OsAS2 の推定アミノ酸配列の比較

Gaufichon ら(2010)の系統発生的解析により、ASをコードする遺伝子がイネ(*Oryza sativa*)に二つ[Os03g0291500 と Os06g0265000; RAP-DB, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>] (Sakai et al., 2013)]存在することが示された。そこで、これらのイネAS遺伝子のゲノム情報をもとに作成した各AS cDNAに特異的な遺伝子primerを用いて、RT-PCRにより全長の各AScDNAをコードするDNA断片を増幅し、クローニングした。そして、Os03g0291500 またはOs06g0265000のコードするASポリペプチドを、OsAS1 (AS1)またはOsAS2 (AS2)と名付けた。OsAS1遺伝子とOsAS2遺伝子は、604個のアミノ酸残基から成る分子量約67.3 kDaと591個のアミノ酸残基から成る分子量約66.2 kDaのポリペプチドを各々コードした。OsAS1とOsAS2の一次アミノ酸配列を相互比較すると、70%の相同性と92%の類似性を示した(Fig. 34)。次に、OsAS1とOsAS2のアミノ酸配列を*Escherichia coli*のAS-Bの結晶構造解析結果(Boehlein et al., 1997a; 1997b; Larsen et al., 1999)と比較した。その結果、推定Gln結合部位のアミノ酸残基は、OsAS1では、Arg50-Asn75-Glu76-Asp99に保存され、OsAS2では、Arg50-Asn75-Glu76-Asp98に保存されていた(Fig. 34, red letters)。推定Asp結合部位のアミノ酸残基は、OsAS1では、Thr317-Thr318-Arg320-Cys524で保存され、OsAS2では、Thr316-Thr317-Arg319-Cys522で保存されていた(Fig. 34, green letters)。また、推定AMP結合部位のアミノ酸残基は、OsAS1では、Leu232-Val268-Ser342-Gly343に保存され、OsAS2では、Leu231-Ile267-Ser341-Gly342 に保存されていた(Fig. 34, orange letters)。特に、OsAS1のCys524残基とOsAS2のCys522残基は、AspとAMPを基質とした酵素反応に必須なアミノ酸残基と推測された(Fig. 34; Boehlein et al., 1997b)。

(2) イネ幼植物根における各 AS 遺伝子 mRNA の発現特性と組織分布の解析

先ず、発芽後18日間水道水で栽培し、種子栄養が枯渇したイネ幼植物の根および各葉位の葉身と葉鞘のOsAS1とOsAS2のmRNAの蓄積量をqPCR解析した。その結果、OsAS1 mRNAは、根で主に発現蓄積し (Fig. 35a)、OsAS2 mRNAは、葉身や葉鞘で主に発現蓄積していた(Fig. 35b)。

同様に、発芽後18日間水道水で栽培したイネ幼植物を、無窒素処理と1 mM NH₄⁺処理後、これらの根を継時的に収穫して、NH₄⁺供与後のイネ幼植物の根における各AS遺伝子の経時的発現変化を解析した。その結果、NH₄⁺供与後のイネ幼植物根では、OsAS1 mRNAが急激に発現蓄積し、NH₄⁺供与後8時間でその蓄積量は最大となり、その後、72時間まで徐々に減少していった(Fig. 35c)。無窒素処理した根でのOsAS1 mRNAの蓄積量は極めて低く、ほぼ一定であった(Fig. 35c)。一方、無窒素処理または1mM NH₄⁺処理した根のAS2 mRNA蓄積も極微量であり、経時的変化も小さかった(Fig. 35d)。コントロールとして用いたactin mRNA量も、無窒素処理または1mM NH₄⁺処理した根においてほぼ同レベルかつ一定であ

った(Fig. 35e)。ここで、1 mM NH₄⁺供給後の幼植物根では、遊離のNH₄⁺とGln、Glu、Asp、Asnが顕著に増加し、吸収されたNH₄⁺が活発に初期同化されていることが示唆された(Fig. 36)。

当研究室の中野の修論研究(2000)におけるAS2抗体を用いたイムノブロット解析により、イネ幼植物の根では、新鮮重当たりのASタンパク質含量は、根の先端(先端より0–30 mm)で最も高いことが報告されていた。しかしながら、このAS2抗体は、OsAS1と相同性の高いOsAS2のアミノ酸配列ペプチドを抗原として作成されたため(鈴木修論, 1998; Nakano et al., 2000)、このAS2抗体は、イネの2分子種のASをとともに認識してしまっている可能性が高いと考えられた。そこで、イネ幼植物根の先端部分における*OsAS1*と*OsAS2*の各mRNAの細胞分布を、*OsAS1*または*OsAS2*のmRNAに各々特異的なRNA probeを用いた*in situ* hybridization法により解析した(Figs. 37, 38)。第7葉齢期まで栽培したイネ幼植物を、3日間水道水で栽培して無窒素処理を行い、その後、さらに6時間の窒素源非添加(-N)または1 mM NH₄Cl添加(+N)処理を行った。1 mM NH₄⁺供与区(+N)の根の先端の伸長帯と成熟帯の表皮・外皮・厚膜組織から成る表層細胞群で、*OsAS1* mRNAの顕著な蓄積が観察された(Fig. 37)。一方、無窒素区(-N)の根では、上記の表層細胞群での*OsAS1* mRNAの蓄積はほとんど認められなかった。また、伸長帯の中心柱組織や分裂帯のほとんどの細胞では、NH₄⁺供与の有無によらず、*OsAS1* mRNAのほぼ構成的な蓄積が認められた。*OsAS2* mRNAの根での発現蓄積量は極めて低いが(Fig. 35)、*in situ* hybridization解析の際の検出時間を長くすることで、*OsAS2* mRNAを検出できた。*OsAS1* mRNAとは対照的に、*OsAS2* mRNAは、無窒素区(-N)のイネ根の先端の成熟帯の表皮・外皮・厚膜組織から成る表層細胞群に蓄積し、NH₄⁺供与区(+N)のイネ根では、これらの表層細胞群での*OsAS2* mRNAの蓄積は観察されなかった(Fig. 38)。また、*OsAS2* mRNAは、NH₄⁺供与区(+N)のイネ根先端の分裂帯において、相対的に高蓄積していることも観察された。

(3) AS1 欠損変異体イネの単離と幼植物根における解析

AS1 欠損変異体イネを獲得するために、農業生物資源研究所のミュータントパネルデータベース(<https://tos.nias.affrc.go.jp/~miyao/pub/tos17/>)によって公開されている、イネゲノム上の *Tos17* 挿入部位の隣接配列情報に対して、*OsAS1* 遺伝子の塩基配列を用いたBLAST 検索を行い、*OsAS1* 遺伝子上に *Tos17* が挿入された可能性のある変異体候補系統(NF7811 と NF4467)を見出した。これらの F1 種子を、農業生物資源研究所から分譲していただき、*OsAS1* 遺伝子の対立遺伝子上に *Tos17* が挿入されたホモ後代系統を選抜した。*OsAS1* 遺伝子の塩基配列上の翻訳開始点を+1 としたときに、NF7811 (*as1-m1*)系統では、*OsAS1* 遺伝子の第 5 イントロンの+1,701 から +1,697 の塩基配列位置に *Tos17* が挿入され、また、NF4467 (*as1-m2*)では、第 2 イントロンの+867 から +863 の塩基配列位置に *Tos17* が挿入されていた(Fig. 39a)。発芽後 18 日間水道水で栽培後、さらに、無窒素処理または 1 mM NH₄⁺処理を 8 時間行った *as1-m1* と *as1-m2* の *Tos17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子

ホモ系統および野生型イネの幼植物の根における、*OsAS1* と *OsAS2* の各遺伝子、 NH_4^+ 初期同化を担う *OsGS1;2* と *OsNADH-GOGAT1* の各遺伝子および *OsGS1;1* 遺伝子の mRNA の定量的発現解析を行った。*as1-m1* と *as1-m2* の *Tbs17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子ホモ系統の根においては、*OsAS1* mRNA は検出されなかった(Fig. 39b)。この結果は、これらの *Tbs17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子ホモ系統では、*OsAS1* 遺伝子が破壊されていることを示した。一方、両 *Tbs17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子ホモ系統の根の *OsAS2*、*OsGS1;1*、*OsGS1;2* の mRNA 発現量は、野生型イネでの発現量と統計的に有意な差はなかった(Fig. 39c, d, e)。*OsNADH-GOGAT1* mRNA の発現量は、無窒素処理した両 *Tbs17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子ホモ系統の根で、野生型イネ根よりもわずかに高かったが、 NH_4^+ 供与後では両 *Tbs17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子ホモ系統での発現量と野生型イネでの発現量に統計的に有意な差は無かった(Fig. 39f)。コントロールとして用いた *actin1* の mRNA 発現量は、 NH_4^+ の供与の有無に関わらず、両 *Tbs17* 挿入 *OsAS1* 対立遺伝子ホモ系統および野生型の間に統計的に有意な差は無かった(Fig. 39g)。これらの結果より、2 系統の AS1 欠損変異体イネが獲得できたと判断した。

発芽後 18 日間水道水で栽培した幼植物の表現型解析の結果では、草丈および地上部の新鮮重が、AS1 欠損変異体系統でわずかに野生型よりも大きく、根長は、AS1 欠損変異体系統で野生型より短かった(Fig. 40)。さらに、発芽後 18 日間水道水で栽培した AS1 欠損変異体系統および野生型イネの幼植物に、窒素源非添加(-N)または 1 mM NH_4Cl 添加(+N)処理を 24 時間行い、これらの地上部と根の全窒素量および全炭素量を測定した。1 mM NH_4^+ 供与区(+N)の AS1 欠損変異体系統の地上部では、野生型と比較して、乾燥重当たりの全窒素量がわずかに減少し、乾燥重当たりの全炭素量はわずかに増加した(Fig. 41b, d)。無窒素区(-N)の根の乾燥重当たりの全炭素量は、AS1 欠損変異体で、野生型よりもわずかに増加した(Fig. 41c)が、 NH_4^+ 供与区(+N)の根では、乾燥重当たりの全窒素量および全炭素量ともに、AS1 欠損変異体系統と野生型で統計的に有意な差はなかった(Fig. 41a, c)。

さらに、発芽後 18 日間水道水で栽培した AS1 欠損変異体系統および野生型イネの幼植物に、窒素源非添加(-N)または 1 mM NH_4Cl 添加(+N)処理を 24 時間行い、これらの根と導管滲出液中の遊離の全アミノ酸含量および Gln と Asn の含量を測定した。無窒素区(-N)と比較して、1 mM NH_4^+ 供与区(+N)の根の全アミノ酸含量は、AS1 欠損変異体系統と野生型で増加したが、AS1 欠損変異体系統と野生型の間で統計的に有意な差は無かった(Fig. 42a)。1 mM NH_4^+ 添加処理(+N)後、野生型の根の Asn 含量は顕著に増加したが、AS1 欠損変異体では野生型の Asn 含量の約 10-20%までしか増加しなかった(Fig. 42b)。また、1 mM NH_4^+ 添加処理(+N)後、野生型の根の Gln 含量も顕著に増加し、AS1 欠損変異体では野生型の Gln 含量よりも約 30%増加した(Fig. 42c)。 NH_4^+ 添加処理後の導管液中の全アミノ酸含量は、AS1 欠損変異体で野生型よりも増加した(Fig. 42d)。 NH_4^+ 供与後の AS1 欠損変異体の導管液中の Asn 含量は、野生型と比較して、約 80-90%減少し、Gln 含量は約 70%増加した(Fig. 42e, f)。ただし、無窒素区(-N)では、幼植物の導管滲出液は得られなかった。

以上の結果から、イネ幼植物根において AS1 が NH_4^+ 供与後の Asn 合成を主に担っていることが判明した。

(4) GS1;2 欠損変異体地上部基部での *OsAS1* と *OsAS2* の各 mRNA の発現量と組織・細胞分布の解析

続いて、GS1;2 の欠損による地上部基部の Asn 量の減少と腋芽の伸長抑制との関連性を明らかにするために、GS1;2 欠損変異体の地上部基部の Asn 量減少の分子的原因を解析した。まず、 NH_4^+ 供与下の野生型と GS1;2 欠損変異体の幼植物の地上部基部における、各 *OsAS* 遺伝子の mRNA 発現量を定量した (Fig. 43)。野生型の地上部基部では、*OsAS1* mRNA が *OsAS2* mRNA よりも約 2 倍高く発現蓄積していた (Fig. 43a)。一方、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、*OsAS2* mRNA の発現蓄積量は同程度であったが、*OsAS1* mRNA の発現蓄積量が約半分に減少していた (Fig. 43a)。

さらに、地上部基部における各 *OsAS* mRNA の組織・細胞分布を解析した (Figs. 44, 45)。その結果、野生型の地上部基部では、*OsAS1* と *OsAS2* の mRNA の強いシグナルが、節網維管束の篩部伴細胞に観察され、弱いシグナルが、茎頂や腋芽の分裂組織および未抽出葉で観察された (Figs. 44a, d, g, 45 a, d, g)。GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、*OsAS1* mRNA の弱いシグナルが、野生型と同様に茎頂や腋芽の分裂組織および未抽出葉で観察されたが (Fig. 44a, b, g, h)、節網維管束の篩部伴細胞における *OsAS1* mRNA のシグナル強度は、野生型と比較して減少した (Fig. 44d, e)。GS1;2 欠損変異体の地上部基部における *OsAS2* mRNA のシグナルは、野生型と同程度に、節網維管束の篩部伴細胞、茎頂や腋芽の分裂組織および未抽出葉で観察された (Fig. 45a, b, d, e, g, h)。また、ネガティブコントロールであるセンスプローブでは、バックグラウンド程度のシグナルが検出された (Figs. 44c, f, I, 45c, f, i)。

従って、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、節網維管束の篩部伴細胞における *OsAS1* の発現量の減少が、基部全体の *OsAS1* 発現量の減少につながったと示唆された。

(5) 地上部基部における *OsAS1* 発現の窒素応答性の解析

次に、イネ地上部基部における、*OsAS1* 発現と GS1;2 の NH_4^+ 同化機能との関連性の有無を調査するために、窒素涸渇処理した野生型および GS1;2 欠損変異体の幼植物に一過的な NH_4^+ 供与を行い、*OsAS1* mRNA の発現量を解析した。また、*OsAS2* mRNA も同様に解析した。窒素枯渇処理した後に 1 mM NH_4^+ を供与すると、野生型の地上部基部において、*OsAS1* mRNA の発現蓄積量が顕著に増加したが、GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、*OsAS1* mRNA の発現蓄積量に変化は認められなかった (Fig. 46a)。また、*OsAS2* mRNA の発現蓄積量は、野生型と GS1;2 欠損変異体の地上部基部において、一過的な NH_4^+ 供与で変化しなかった (Fig. 46b)。

この際、地上部基部の Asn 含量を解析すると、窒素枯渇処理した後に 1 mM NH_4^+ を供与

した野生型イネの地上部基部では、 NH_4^+ を供与していない野生型イネの地上部基部と比較して、顕著にAsn量が増加した(Fig. 46d)。他方、GS1;2欠損変異体の地上部基部では、1 mM NH_4^+ を供与後、Asn量に有意な変化は認められなかった(Fig. 46d)。

ここで、第三章の研究により、窒素涸渇処理後の根に NH_4^+ を供給した野生型と GS1;2 欠損変異体の両幼植物の地上部基部では Gln が蓄積したが、野生型と比較して、GS1;2 欠損変異体の地上部基部での Gln 増加量は低かった(Fig. 27c)。そこで、さらに *OsAS1* mRNA 発現の Gln 応答性を解析した。野生型幼植物を窒素枯渇処理後、1 mM の GS 活性阻害剤 MSX で 2 時間処理を行い、先の解析と同様に 1 mM NH_4^+ を供与したところ、地上部基部での NH_4^+ 供与後の *OsAS1* mRNA の発現蓄積量の増加が観察されなくなった(Fig. 47a)。また、 NH_4^+ の代わりに、5 mM Gln を供与したところ、地上部基部の *OsAS1* mRNA の発現蓄積量の増加が認められた(Fig. 47a)。この結果は、 NH_4^+ 供与後のイネ根において AS のタンパク質含量と活性の増加が、MSX 処理で完全に阻害されたという知見(Kawachi et al., 2002)からも支持される。一方、地上部基部の *OsAS2* mRNA は、MSX 処理で発現蓄積量が増加したが、 NH_4^+ や Gln 供与によって蓄積量に変化は認められなかった (Figs. 46b, 47b)。

以上の結果から、 NH_4^+ 供与後のGS1;2欠損変異体の地上部基部では、Gln量の減少により、節網維管束節部伴細胞のGln応答性の*OsAS1*のmRNA発現蓄積が減少し、Asn量が減少することが示唆された。

(6) AS1 欠損変異体イネ地上部基部の Asn 量と分げつ数の解析

さらに、AS1 欠損変異体を用いて、AS1 の分げつ成長への重要性を解析した。 NH_4^+ 供与下の AS1 欠損変異体では、野生型と比較して、地上部基部の Asn 量が顕著に減少し、Gln および NH_4^+ の量は変化しなかった(Fig. 48)。そこで続いて、AS1 欠損変異体を用いて、分げつ数の測定を行った(Fig. 49)。1 mM あるいは 2 mM の NH_4Cl を含む水耕液を用いて栽培を行い、経時的に葉齢および分げつ数を測定したところ、分げつ成長期初期において、AS1 欠損変異体と野生型の葉齢および分げつ数の間に統計的に有意な差はなかった(Fig. 49a-d)。また、東京大学大学院農学生命科学研究科 佐々木 和浩博士との共同研究により、東京大学大学院農学生命科学研究科付属 田無演習林の水田にて栽培を行い、出穂期直前に分げつ数を測定したところ、AS1 欠損変異体と野生型の分げつ数の間に統計的に有意な差はなかった(Fig. 49e)。この時、AS1 欠損変異体では、野生型と比較して草丈が減少したが、葉緑素含量を示す値である SPAD 値には変化がなかった(Fig. 49f, g)。

OsAS1	MCGILAVLGAADWSQAKRAHVLSCSRRLKHRGPDWSGLYQCEGNFLAQQRLAIVSPLSGD	60
OsAS2	*****V**V*L***SRI IEL****R*****IHCYQDCY**H**D*T***	60
OsAS1	QPLYNADRTIVVVA ^{NGE} IYNHKKIRKQFASKHTFSTGSD ^D CEVI IPLYEEYGEDFVMDLDG	120
OsAS2	*****E*KS***TV ^{**} *****EELKANLK*~*K*Q*A ^{**} *****AH*****E*****	119
OsAS1	VFAFVLYDTRTKTYMAARDAIGVNPLYIGRGSDGAVWISSEM ^K ALNEDCVEFEIFPPGHL	180
OsAS2	M*****L***D*SF I*****I C***M*W*L**S**F*****SD**ER*IS*****	179
OsAS1	YSSAAGGLRRWYKPQWFAENVPATPYQPLLLREAFEKAVIKRLMTDVPFGV ^L LSGGLDSS	240
OsAS2	***KT*****N*P**S*S I*S***N*****QS*****I***** [*] *****	239
OsAS1	LVAAVTKRHLIKTEAAEFGAELHSFV ^V GLEGSPDLIAAREVADHLGTIHHEFHFTVQDG	300
OsAS2	***S*VS***AEAKV*AQW*NK**T*C ^I **K*****R**K***Y***V***L*****E*	299
OsAS1	IDAIEEVIYHDETYDV ^{TTIR} ASTPMFLMARKIKALGVKMVL ^{SG} EGSDELLGGYLYFHFAP	360
OsAS2	***L*****V***** ^{***} *****S*****S***** [*] *****IF*****K**	359
OsAS1	NKEEFHKETCRKVKALHQYDCLRANKATSAWGLEVRVPFLDKEFINVAMSMDPEWKMYNA	420
OsAS2	**K***E*****I***L*****S*****V*A*****N*****DI*****IKR	419
OsAS1	DLGRIEKWVMRKA ^F DDEEHPYLPKHILYRQKEQFSDGVGYNWIDGLKAFTEQQVSD ^{EM} MMK	480
OsAS2	*****L*N*****K*****S*****D-HANEHVSDS*M	478
OsAS1	NAAK-VYPHNTPVNKEAYYYRMIFERLFPQESARETVPWGPSIA ^C STPAAIEWVEQWKAS	539
OsAS2	MN*SF***E*****T*****T***KF**KNA**L***G***V [*] ***-----A**V	529
OsAS1	HDPSGRLIASHNSASASANHTNHANANANGNSNGKANGNCAMAANGTNGVGLVVANGTAN	599
OsAS2	EW-DAA---W*K*LDP ^S GRAALGVHD*AYEDTLQKSPASANPVL ^D **FGPALGESMVK*VA	586
OsAS1	GKMEA	604
OsAS2	SATAV	591

Figure 34. Alignment of the deduced amino acid sequences between OsAS1 and OsAS2 polypeptides. The deduced amino acid sequences are denoted as one-letter code representing each amino acid. Asterisk symbols in the OsAS2 sequence indicate identical amino acid residues to those of OsAS1. Amino acid residues for the putative glutamine binding-, aspartate binding-, and AMP anchoring-sites are indicated with red, green and orange letters, respectively.

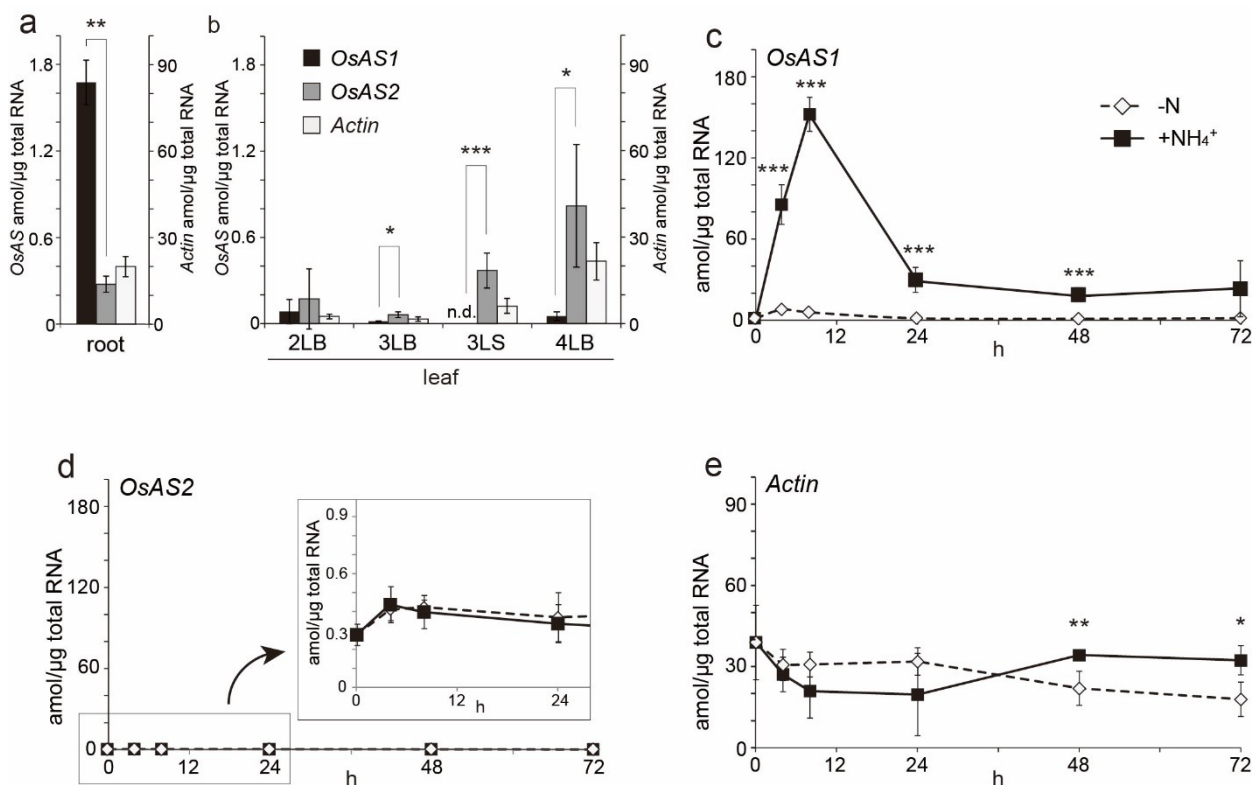


Figure 35. Quantitative real-time PCR detection of transcripts for *OsAS1* (black column) and *OsAS2* (gray column) in roots (a) and leaf blades (LB) and leaf sheaths (LS) at different leaf positions (b) in rice. Time course studies on the detection of *OsAS1* (c) and *OsAS2* transcripts (d) in rice roots was conducted in the presence or absence of 1 mM NH_4^+ . The inset is a magnified figure taken in the first 24 h in (d). *Actin* was used for a control. Rice plants were grown hydroponically for 18 d in water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH) and harvested each organ: whole roots, second leaf blades (2LB), third leaf blades (3LB), third leaf sheaths (3LS), and fourth expanding leaf blades (4LB). For the time course study, the 18 d-old seedlings were grown further for 72 h. Quantitative real-time PCR was performed using gene-specific primers for *OsAS1*, *OsAS2* and *actin1*, respectively. Mean values plus the SD of four independent plants are indicated. n.d., not detected. The asterisks denote the statistically significant differences between *OsAS1* and *OsAS2* in (a, b) or plants with and without 1 mM NH_4^+ in (c-e) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ according to Student's *t*-test).

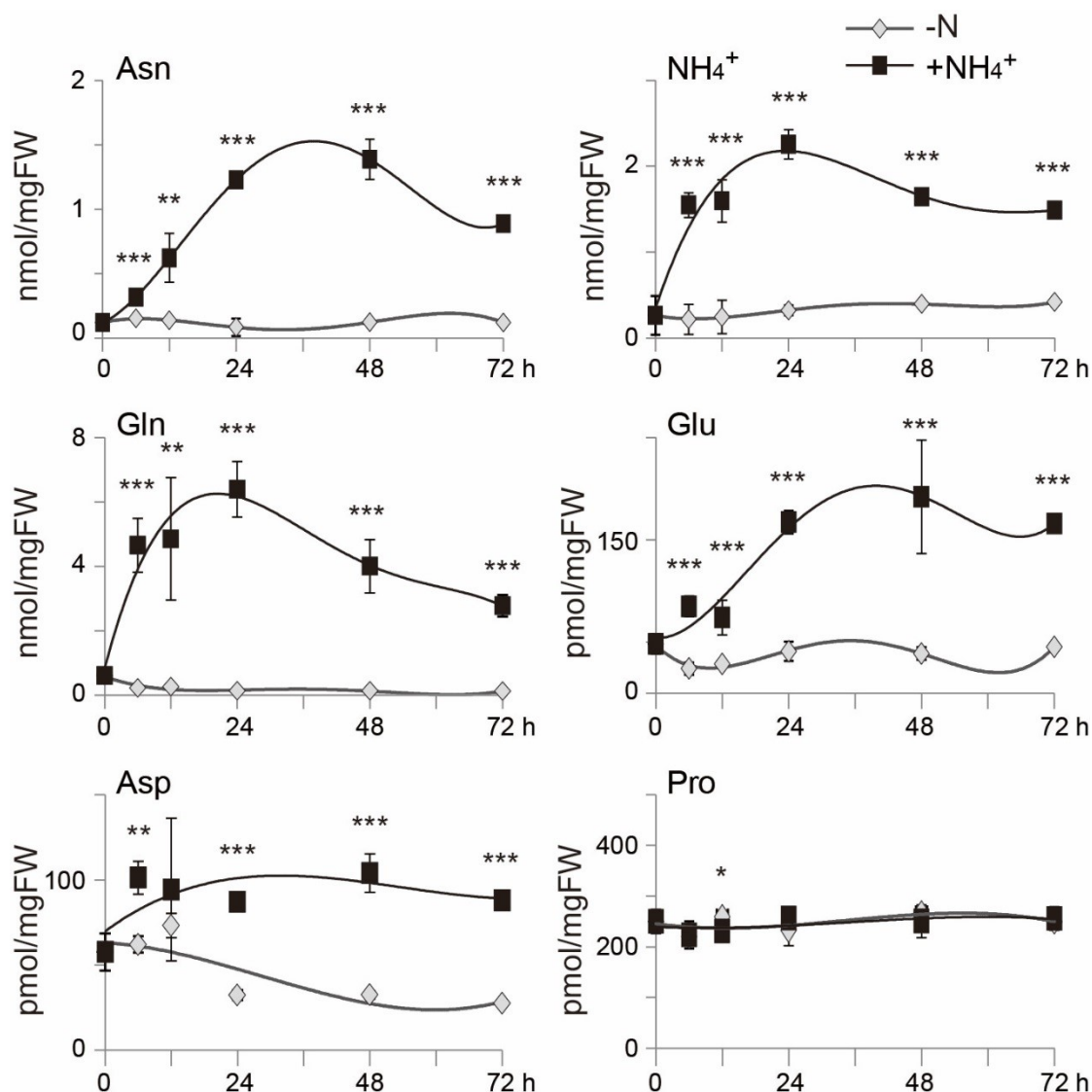


Figure 36. Changes in the contents of free amino acids and NH_4^+ in roots during 72 h in the presence (+N) (filled boxes) or absence (-N) (open diamonds) of 1 mM NH_4^+ . Rice plants were grown for 18 d in water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH). The seedlings were then transferred into fresh water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH) in the presence or absence of 1 mM NH_4^+ . Mean values plus the SD of four independent plants are indicated. The asterisks denote the statistically significant differences between plants with and without 1 mM NH_4^+ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ according to Student's *t*-test).

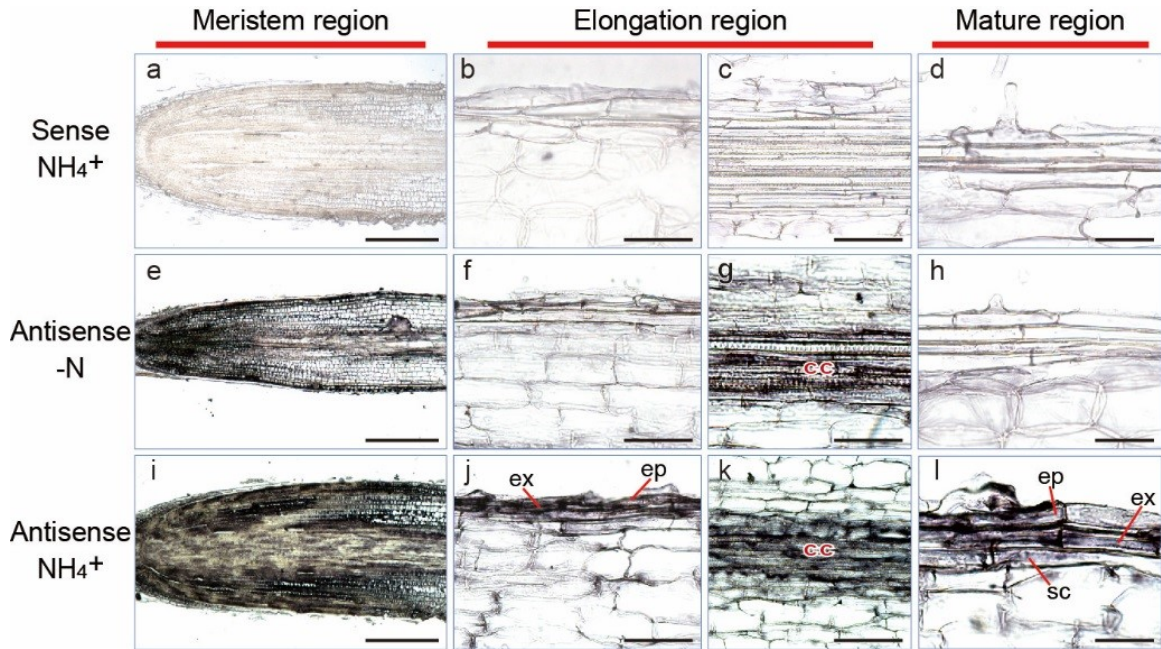


Figure 37. *In situ* detection of the *OsAS1* transcript in rice root tips. Rice plants were grown hydroponically until the 7th-leaf stage in a basal nutrient solution containing 1 mM NH_4^+ . The plants were then grown for 3 d in water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH), then transferred into the fresh water in the presence (+N) or absence (-N) of 1 mM NH_4^+ (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH). Root tissues were harvested at 6 h after the transfer and separated into three sections (meristem region, elongation region, and mature region). The sense probe for *OsAS1* was hybridized with the longitudinal sections from the NH_4^+ -fed plants as a negative control (a—d). Antisense probe for *OsAS1* was hybridized with the sections from rice roots grown in the absence (e—h) or presence of 1 mM NH_4^+ (i—l). cc, central cylinder; ex, exodermis; ep, epidermis; sc, sclerenchyma. Bars = 200 μm (a, e, i), 100 μm (b, c, f, g, j, k), and 25 μm (d, h, l).

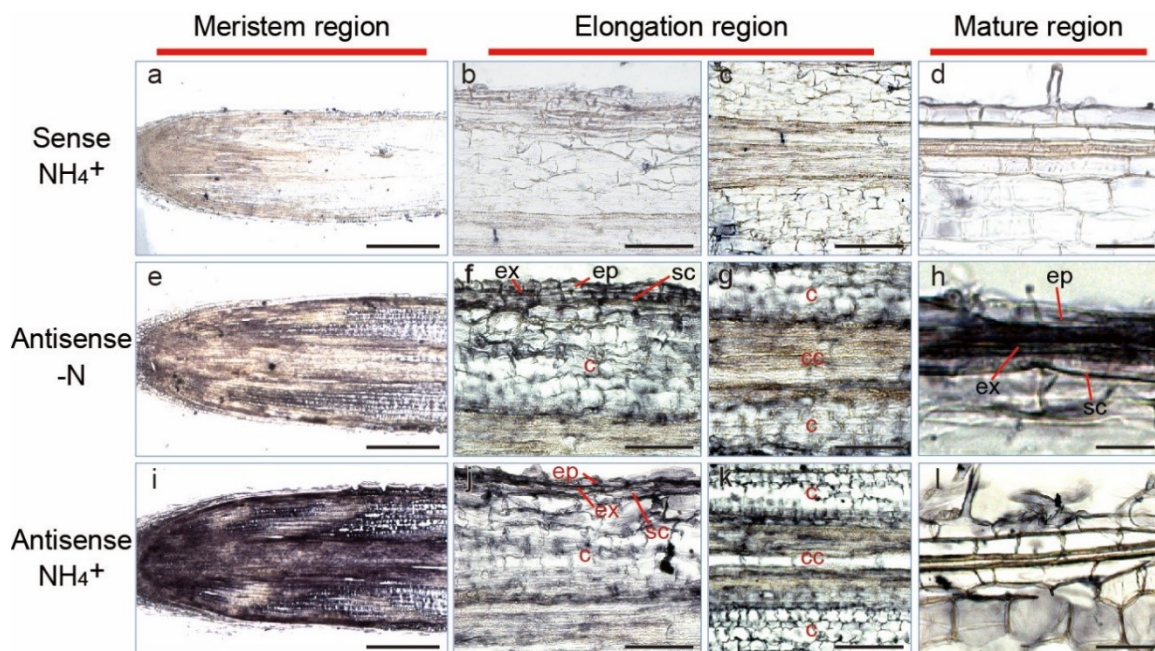


Figure 38. *In situ* detection of the OsAS2 transcript in rice root tips. Rice plants were grown as described in legend of Fig. 37. The sense probe for OsAS2 was hybridized with the longitudinal sections from the NH_4^+ -fed plants as a negative control (a—d). Antisense probe for OsAS2 was hybridized with the sections from rice roots grown in the absence (e—h) or presence of 1 mM NH_4^+ (i—l). cc, central cylinder; c, cortex cells; ex, exodermis; ep, epidermis; sc, sclerenchyma. Bars = 200 μm (a, e, i), 100 μm (b, c, f, g, j, k), and 25 μm (d, h, l).

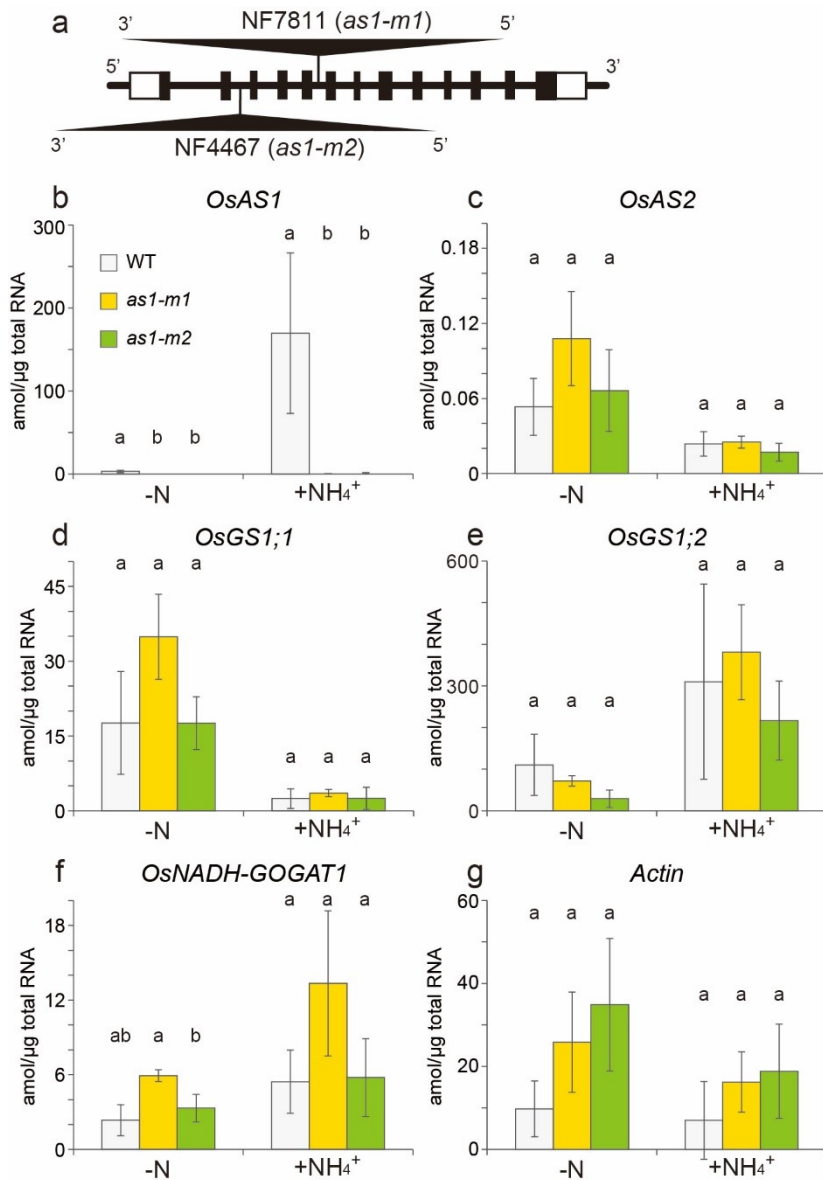


Figure 39. Isolation of AS1 knockout mutants of rice. (a) Diagram of the insertion position of the retrotransposon *Tos17* (triangle) in *OsAS1*. Exons are indicated as boxed regions, whereas lines represent introns and open boxes correspond to 5'- and 3'-untranslated sequences. Quantitative real-time PCR detection of transcripts was conducted for *OsAS1* (b), *OsAS2* (c), *OsGS1;1* (d), *OsGS1;2* (e), *OsNADH-GOGAT1* (f), and *actin1* (g) from roots of wild type and two lines of AS1 knockout mutants (*as1-m1* and *as1-m2*). Wild type plants (open columns) and two lines of AS1 knockout mutants (*as1-m1*, yellow columns; *as1-m2*, green columns) were grown for 18 d in water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH). The seedlings were grown further in fresh water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH) in the presence (+NH₄⁺) or absence (-N) of 1 mM NH₄⁺ for 8 h. Mean values plus the SD of four independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences in transcript contents between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

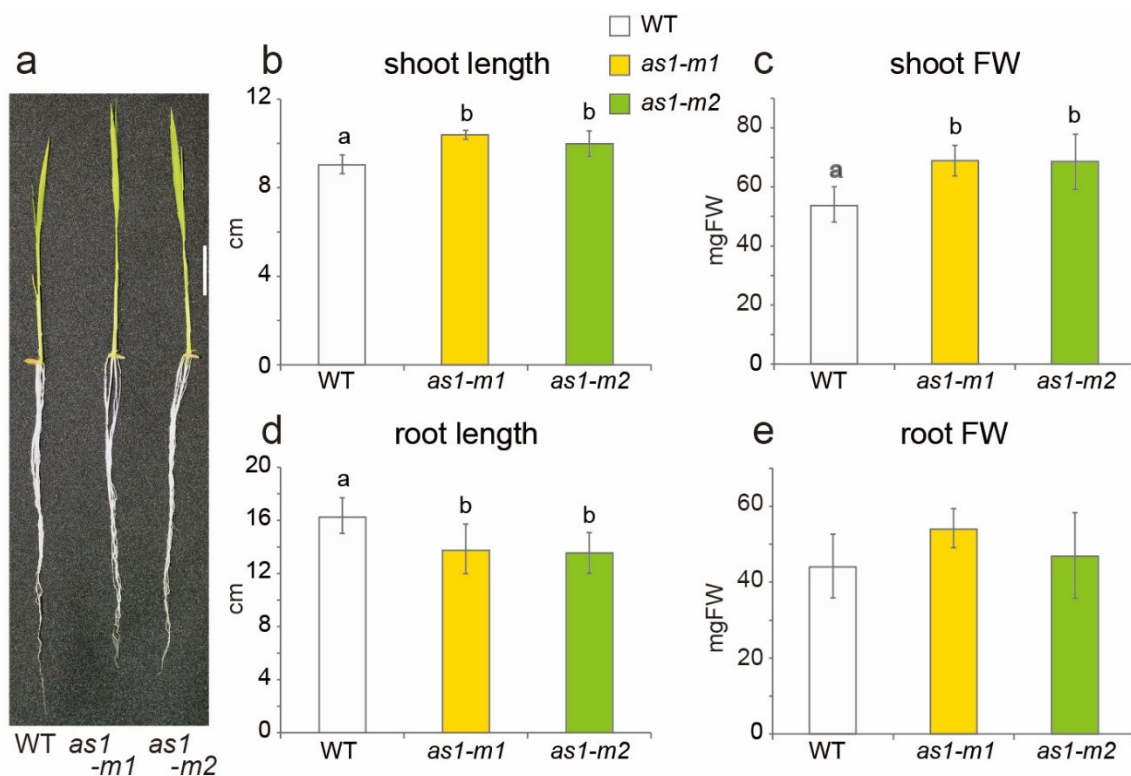


Figure 40. Phenotypic characteristics of the AS1 knockout mutants. Wild-type rice (WT) and two lines of the knockout mutants (*as1-m1* and *as1-m2*) were grown for 18 d in water (a). Shoot length (b), shoot fresh weight (c), root length (d) and root fresh weight (e) were determined. Mean values plus the SD of ten independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

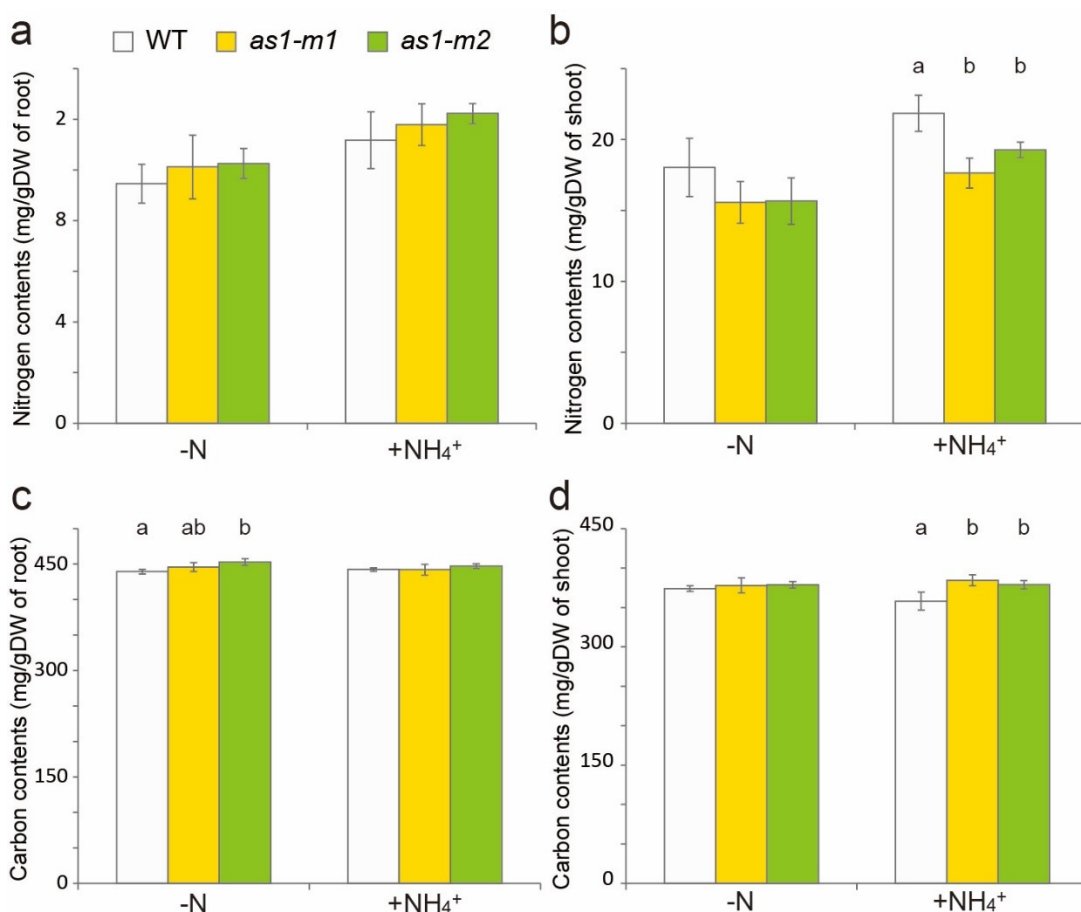


Figure 41. Determination of total nitrogen (a, b) and total carbon (c, d) in roots (a, c) and shoots (b, d) of wild-type rice (WT) and two lines of AS1 knockout mutants (*as1-m1* and *as1-m2*). Rice seedlings were first grown for 18 d in water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH). Then, the seedlings were transferred to the fresh water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH) in the presence (+NH₄⁺) or absence (-N) of 1 mM NH₄⁺. Mean values plus the SD of five independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

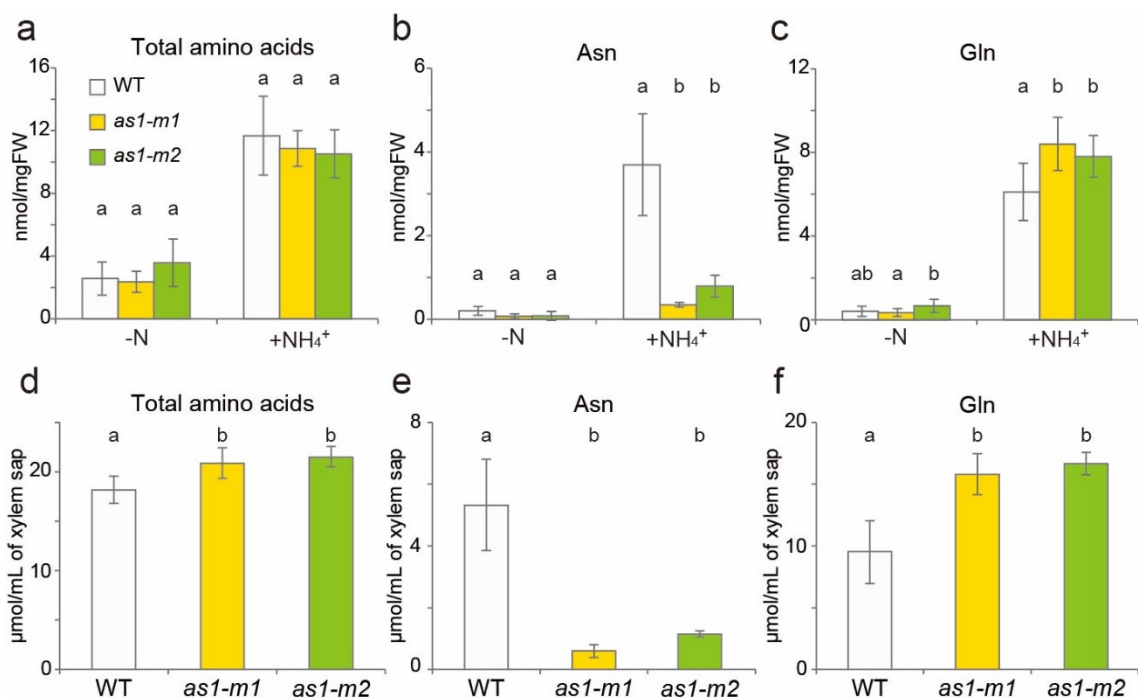


Figure 42. Comparison of total free amino acids (a, d), Asn (b, e) and Gln (c, f) in roots (a—c) and xylem sap (d—f) of wild-type rice (WT) and two lines of AS1 knockout mutants (*as1-m1* and *as1-m2*). Rice seedlings were grown for 18 d in water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH). The seedlings were then transferred to fresh water (pH 5.5 adjusted with 5 mM MES-NaOH) in the presence (+NH₄⁺) or absence (-N) of 1 mM NH₄⁺ and grown for 24 h. Xylem sap was collected from the cut surface as described previously (Funayama et al. 2013). Contents of amino acids in xylem sap were only determined in rice seedlings grown in the presence of 1mM NH₄⁺, because there was little exudation of xylem sap from the cut surface of rice grown in the absence of NH₄⁺. Mean values plus the SD of four independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

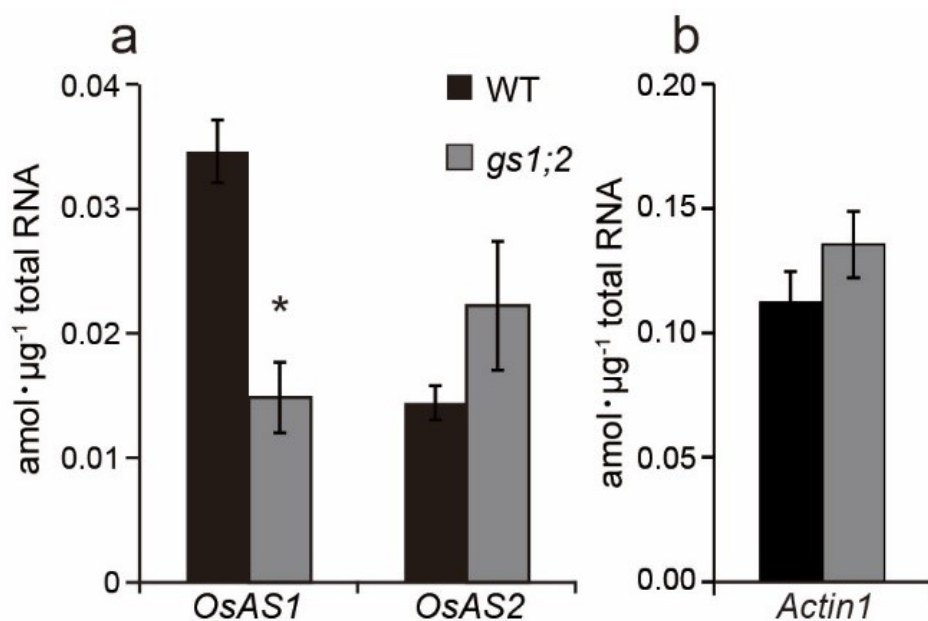


Figure 43. Quantitative real-time PCR detection of OsAS transcripts in the basal parts of wild-type rice (WT) (black columns) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (gray columns) at the 4th-leaf stage. (a) OsAS genes (*OsAS1* and *OsAS2*). (b) Expression of *actin1* used as a control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. The asterisk denotes the statistically significant difference between the WT and *gs1;2* (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

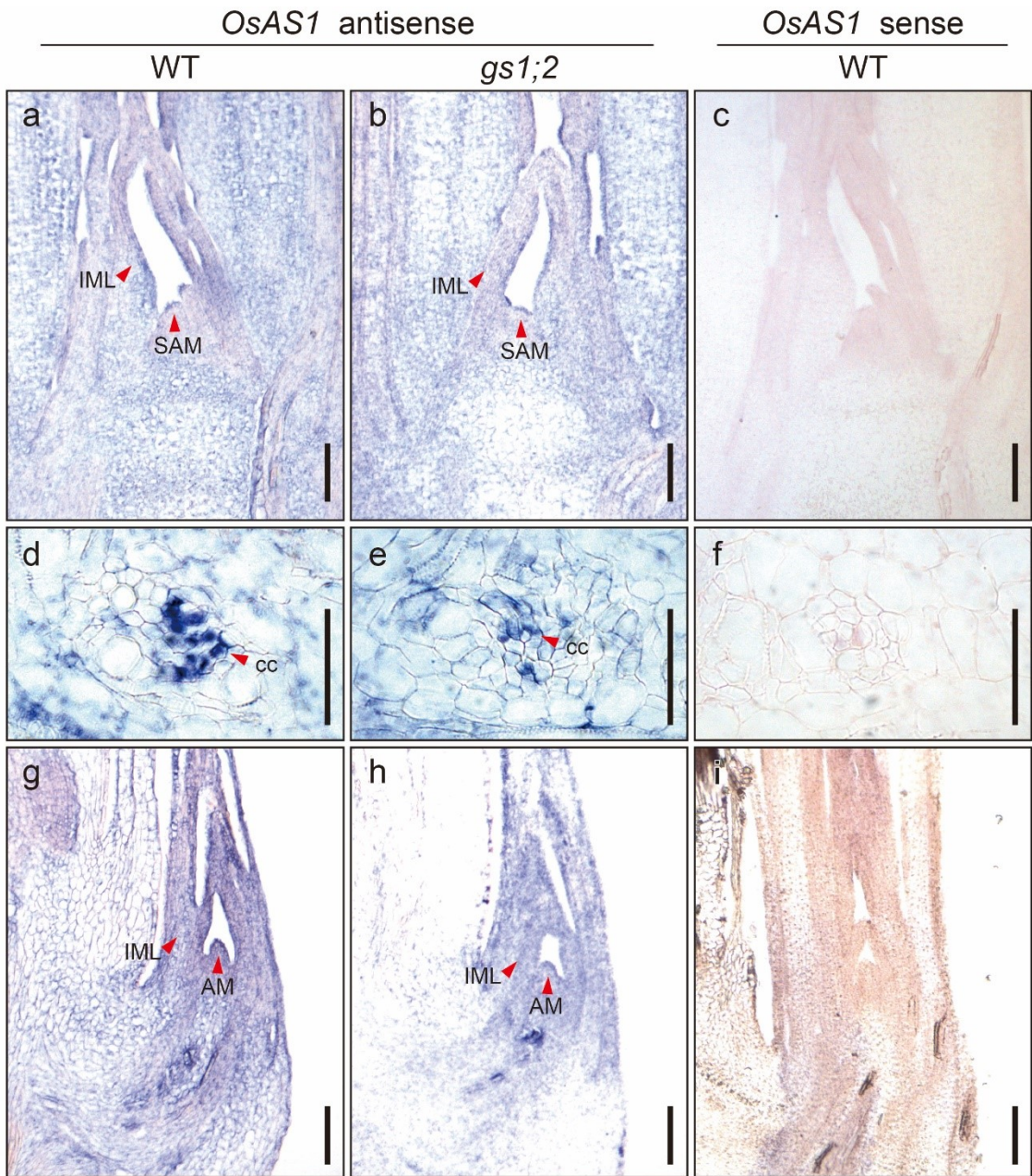


Figure 44. *In situ* localization of the *OsAS1* transcript in longitudinal sections of shoot basal parts prepared from wild-type rice (WT) (a, d, g) and the *GS1;2* knockout mutant (*gs1;2*) (b, e, h) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to WT sections (c, f, i) as a negative control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . Red arrowheads indicate hybridization signals of the *OsAS1* transcript in the shoot apical meristem (SAM) (a, b), phloem companion cells of the nodal vascular anastomoses (cc) (d, e), the immature leaf (IML) area (a, b, g, h) and the tiller containing the axillary bud meristem (AM) (g, h). Note that the signal in *gs1;2* (e) was extremely weaker than that in WT (d). Scale bars = 100 μm (a—c, g—i) and 50 μm (d—f).

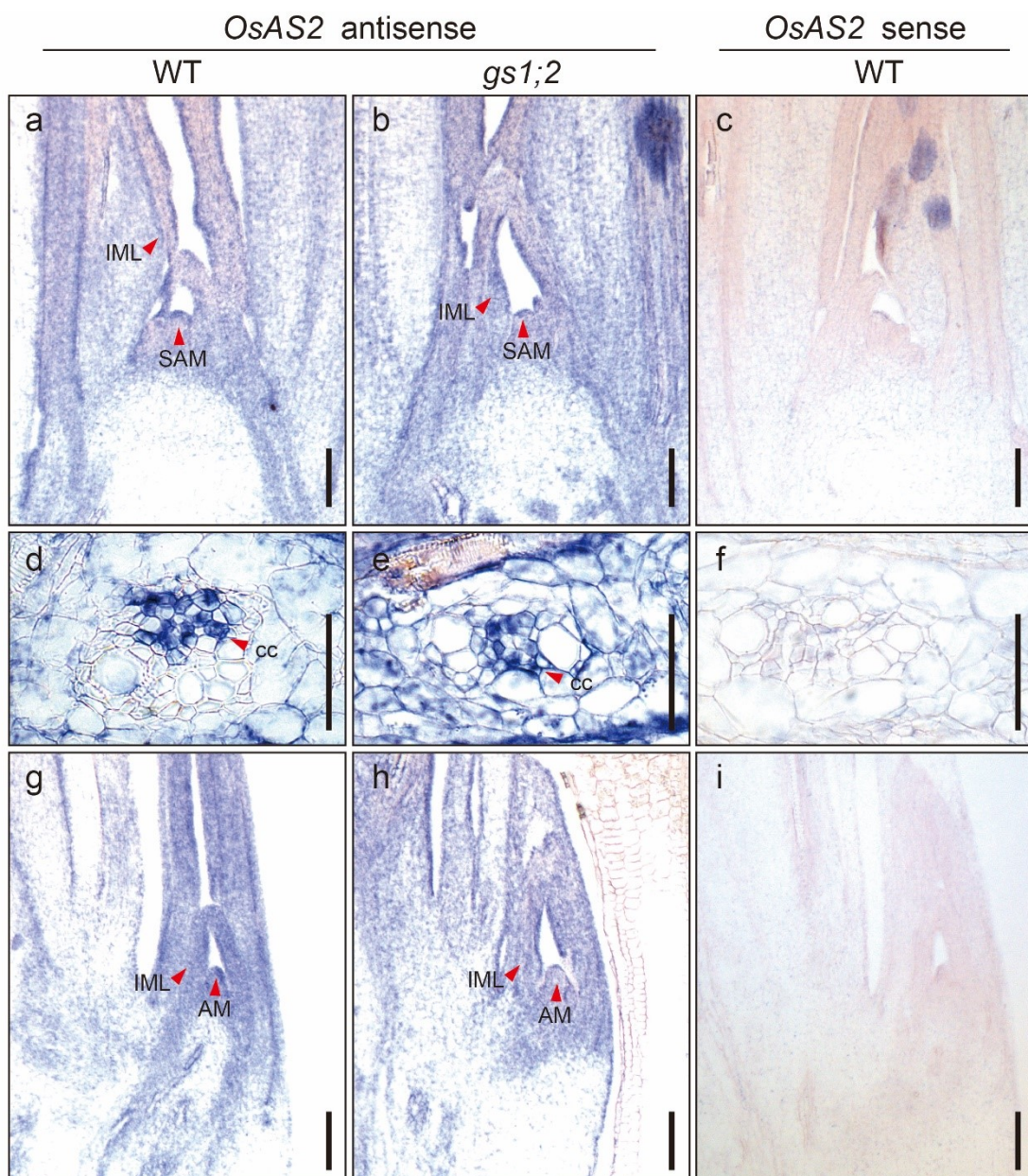


Figure 45. *In situ* localization of the OsAS2 transcript in longitudinal sections of shoot basal parts prepared from wild-type rice (WT) (a, d, g) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (b, e, h) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to WT sections (c, f, i) as a negative control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. Red arrowheads indicate hybridization signals of the OsAS2 transcript in the shoot apical meristem (SAM) (a, b), phloem companion cells of the nodal vascular anastomoses (cc) (d, e), the immature leaf (IML) area (a, b, g, h) and the tiller containing the axillary bud meristem (AM) (g, h). Scale bars = 100 μ m (a—c, g—i) and 50 μ m (d—f).

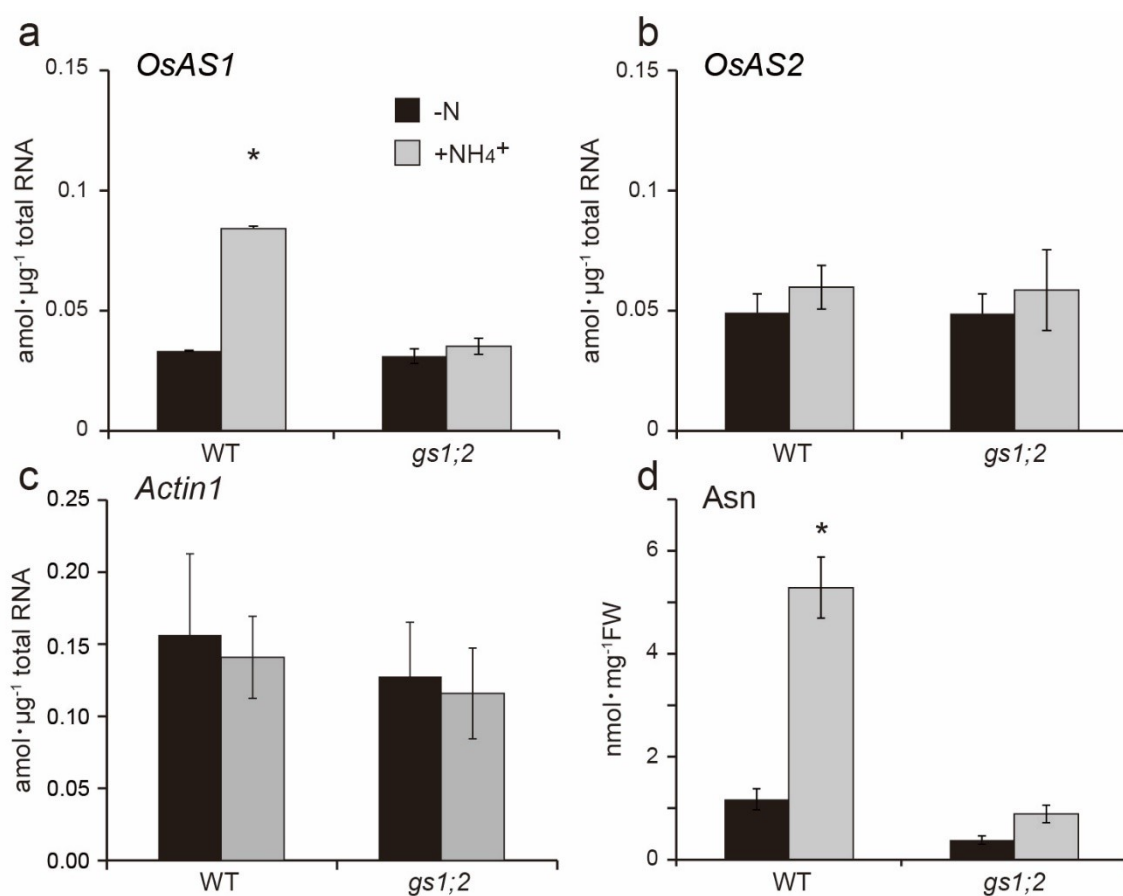


Figure 46. Quantitative real-time PCR detection of *OsAS* transcripts and determination of the Asn content in the basal parts of wild-type rice (WT) and the *GS1;2* knockout mutant (*gs1;2*). (a—c) Transcript levels of *OsAS1* (a), *OsAS2* (b) and control *actin1* (c) in the shoot basal parts of seventh-leaf stage seedlings grown in water for 3 d followed by treatments with (+NH₄⁺) or without (-N) 1 mM NH₄Cl for 8 h. (d) Contents of Asn in the shoot basal parts of fourth-leaf stage seedlings grown in water for 3 d followed by treatments with or without 1 mM NH₄Cl for 24 h. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between plants treated with and without 1 mM NH₄Cl (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

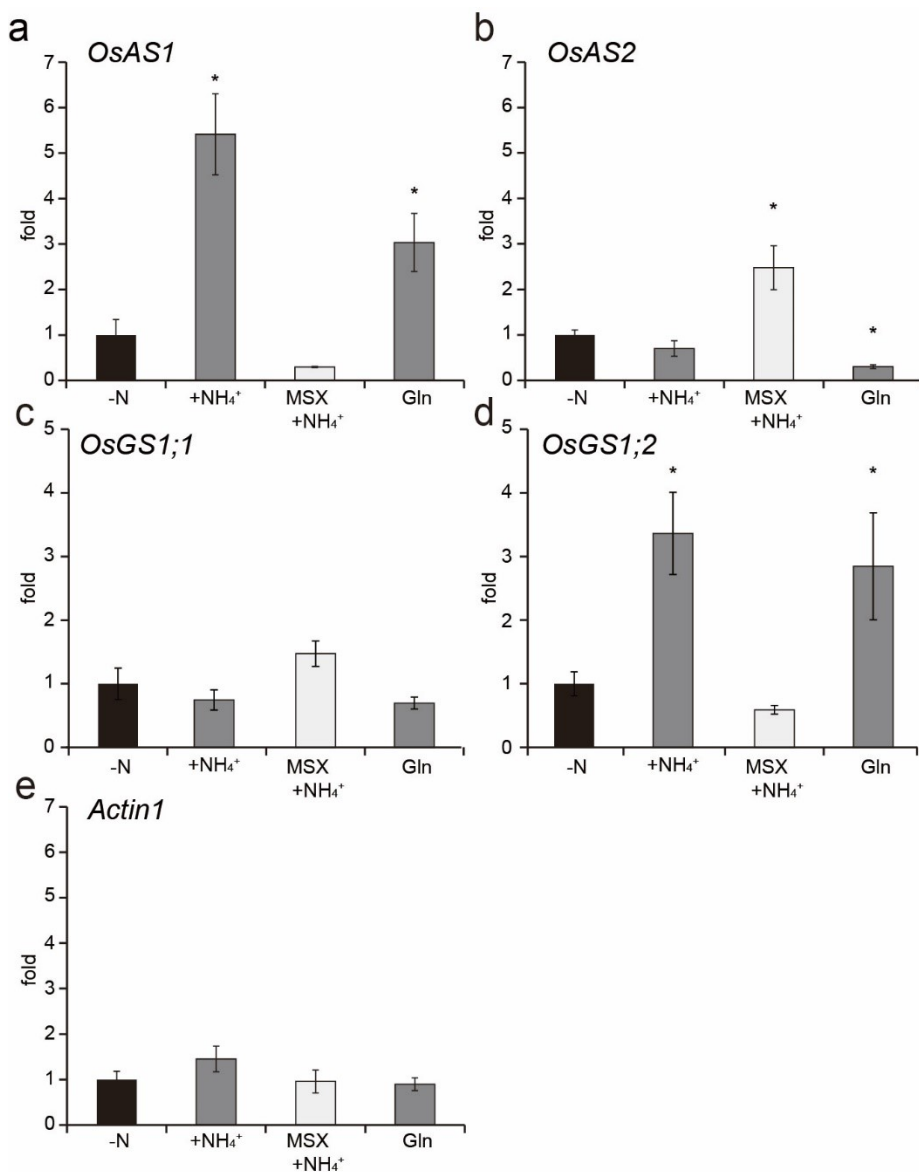


Figure 47. Gln-responsive expression of the *OsAS1* transcript in the shoot basal parts of rice seedlings. (a—c) Quantitative real-time PCR detection of transcripts for *OsAS1* (a), *OsAS2* (b), *OsGS1;1* (c), *OsGS1;2* (d) and control *actin1* (e) in the basal parts of wild-type rice. Rice seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl until the 3rd-leaf stage and then on water for 3 d, followed by being pretreated with or without 1 mM MSX for 2 h. Seedlings pretreated with MSX were grown in the presence of 1 mM NH₄Cl (MSX + NH₄⁺) for 8 h, while seedlings without the MSX-pretreatment were grown in the absence (-N) or presence of 1 mM NH₄Cl (+NH₄⁺) or 5 mM Gln (Gln) for 8h. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between -N sample and each nitrogen-treated sample (**P* < 0.05 according to the Student's *t*-test).

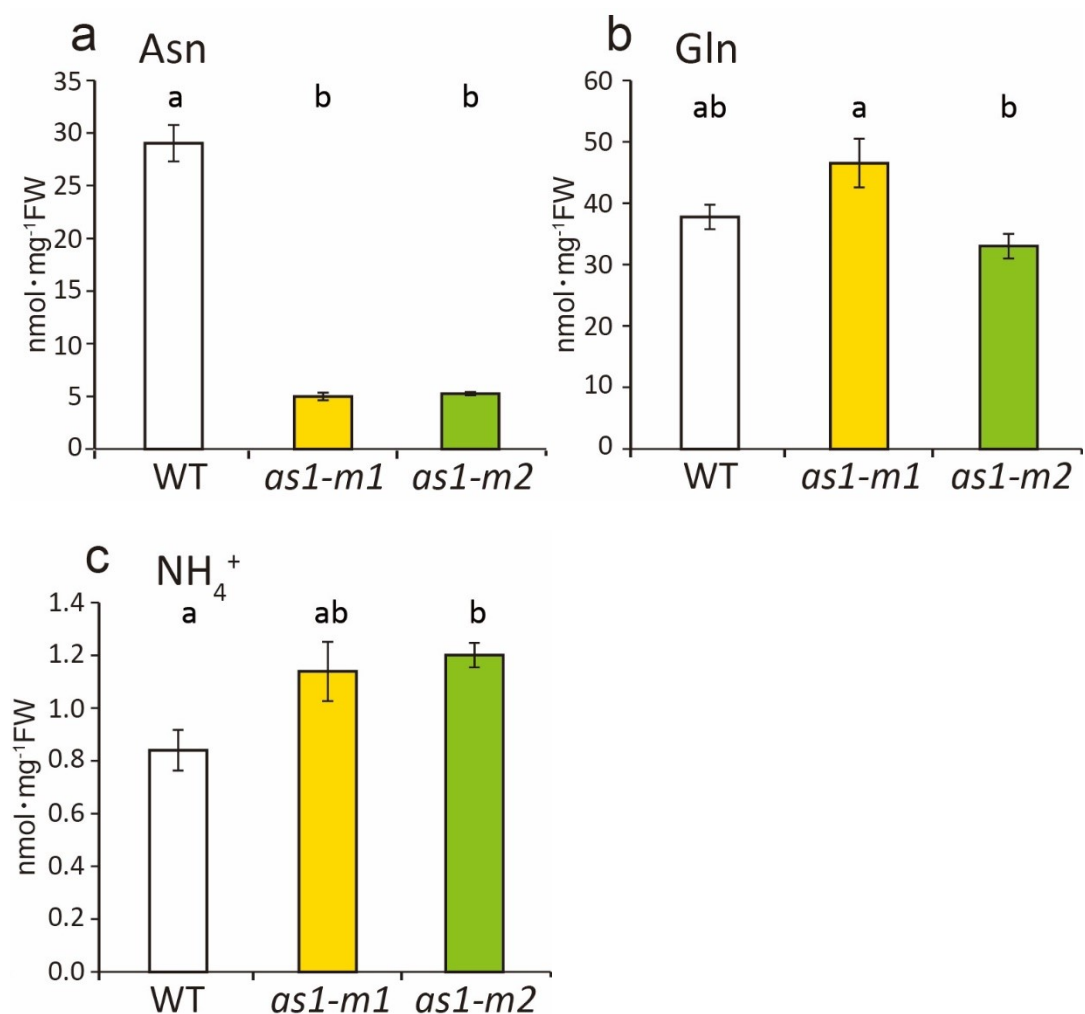


Figure 48. Comparison of Asn (a), Gln (b) and NH₄⁺ (c) contents in the shoot basal parts of the wild-type rice (WT) and AS1 knockout mutants (*as1-m1* and *as1-m2*) at the 4th-leaf stage. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

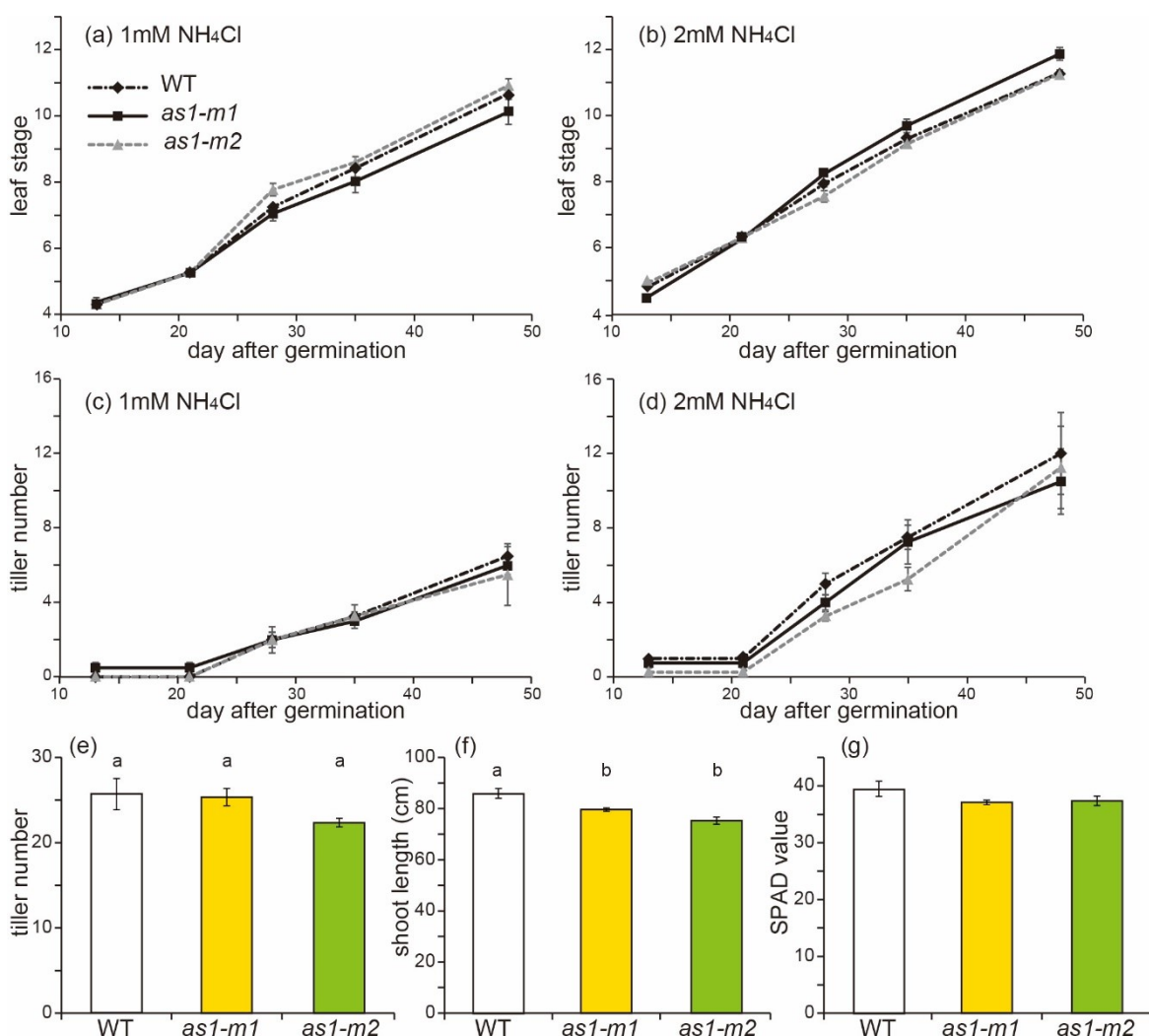


Figure 49. Comparison of the leaf age (a, b), the tiller number (c–e), the shoot length (f), and SPAD values (g) of wild-type rice (WT) and AS1 knockout mutants (*as1-m1* and *as1-m2*). (a–d) Seedlings grown hydroponically in the presence of 1 mM (a, c) or 2 mM NH₄Cl (b, d) until 50 days after germination. (e–g) Plants at panicle initiation stage, which were grown in the paddy fields. Mean values plus the SE of four (a–d) or five independent plants (e–g) are indicated. Different letters at the top of each column in (e, f) denote statistically significant differences between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

Putative ammonium response region of *OsAS1* promoter

-495 TTGACTACAGATTTATAGTCCACCTCTCTCTATTTTTATCTCTTT -451

TTGAC, WRKY binding region; GANNTG, bHLH binding region; ATTTTA, Enhancer binding region; CTTT, Dof binding region

Figure 50. Putative ammonium response region of *OsAS1* promoter. The part of *OsAS1* promoter region is shown from -451 to -495, where the translation start site is +1. Yellow region indicates WRKY binding region (-495 GTCAA -491). The green region indicates the putative basic-helix-loop-helix (bHLH) binding region (-475 CAACTC -470). The purple region indicates the putative soybean embryo factor 4 (SEF4) binding region (-464 ATTTTAA -458). The red region indicates the putative DNA-binding one zinc finger (DOF) binding region (-454 CTTT -451).

第四節 考察

本章の研究では、GS1;2 欠損変異体イネにおける、分げつ数の減少と Asn 代謝の変化との関連性を検討することを目的とした。まず、Gln を基質とした Asn 合成を担う AS の 2 分子種(*OsAS1* と *OsAS2*)の時空間的発現特性の比較解析および *AS1* 遺伝子破壊イネ変異体系統を用いた逆遺伝学的な解析により、*AS1* のイネ根の窒素代謝における生理学的機能を明らかにした。その上で、NH₄⁺供給下の GS1;2 欠損変異体イネの地上部基部を用いて、各 AS 遺伝子の組織・細胞レベルでの発現や Asn 代謝の変化を解析するとともに、*AS1* 遺伝子破壊イネ変異体系統の分げつ数の変化を解析した。

イネ幼植物根における、*OsAS1* および *OsAS2* の各 mRNA の NH₄⁺ に応答した発現特性 (Fig. 35) や組織・細胞分布 (Figs. 37, 38) の違いにより、イネ AS の 2 分子種がそれぞれ異なった生理機能を担っている可能性が示唆された。NH₄⁺ 供与に応答した根の表皮・外皮・厚膜組織から成る表層細胞群における *OsAS1* の発現特性は、*OsGS1;2* や *OsNADH-GOGAT1* の発現様式と同様である (Ishiyama et al., 2003; 2004; Tabuchi et al., 2007; Yamaya and Kusano, 2014)。GS1;2 や NADH-GOGAT1 は根における NH₄⁺ の初期同化に重要な役割を持つことが示されており (Tamura et al., 2010; Funayama et al., 2013; Yamaya and Kusano, 2014)、*AS1* は、GS1;2 や NADH-GOGAT1 のように NH₄⁺ 供与後に発現が増加することから、GS1;2 および NADH-GOGAT1 と同様に、*AS1* もイネ根における NH₄⁺ 初期同化に関与することが考えられる。

ここで、イネでは、不透水性のカスパリ線が根の外皮と内皮の細胞間に各々存在し (Morita et al., 1996)、これらの細胞ではアポプラストを介した水養分の移動が阻害される。水田で栽培されるイネにおいては、外皮のカスパリ線は、根からの酸素の流出を防ぐことに役立っていると考えられている (Watanabe et al., 2014)。NH₄⁺ から Gln や Asn へと同化された窒素は、外皮細胞と内皮細胞においては、シンプラスト経路によってカスパリ線を越えて皮層や中心柱へと輸送されていくと考えられる。NH₄⁺ 供与後の *AS1* 欠損変異体イネで、根の遊離の Asn 含量が大きく減少したことは (Fig. 42b)、*AS1* が、NH₄⁺ 供与後の根の Asn 合成に寄与していることを示唆する。さらに、NH₄⁺ 供与後の *AS1* 欠損変異体の導管液の遊離の Asn 含量も著減したことは (Fig. 42e)、*AS1* が根の導管へ送り出される Asn の合成にも寄与していることを示唆する。実際、イネ幼植物根の中心柱では、*OsAS1* および *OsAS2* は、AS 酵素反応の基質である Gln を生合成する GS1;1 と GS1;2 の各遺伝子 (Ishiyama et al., 2004) と同様に、NH₄⁺ の供与の有無に関わらず恒常的に発現していた (Figs. 37, 38)。これらの結果から、導管を介した根から地上部への Asn 輸送のために、Asn が中心柱でも合成されることが推察される。

一方、イネ根の表層細胞群において、窒素枯渇処理下で発現蓄積し、NH₄⁺ 供与下で発現抑制される *OsAS2* の発現特性 (Fig. 38) は、*OsGS1;1* と同様である (Tabuchi et al., 2007)。さらに、GS1;1 タンパク質 (Sakurai et al., 1996; Tabuchi et al., 2007) と同様に、*OsAS2* は

主に葉身や葉鞘で発現していることから(Fig. 35; Nakano et al., 2000)、イネ葉における AS2 は、GS1;1 と同様に老化時の Asn の転流に関わる可能性が考えられる。

ここで、NH₄⁺供給下で発現変動する、窒素の吸収や代謝に関連するいくつかの遺伝子群は、直接的に NH₄⁺をシグナルとせず、Gln やその代謝産物をシグナルとして発現調節されることが報告されている(Tabuchi et al., 2007)。イネでは、アンモニウム輸送体 1;2 遺伝子 (*OsAMT1;2*)や *OsNADH-GOGAT1* 遺伝子およびサイトカイニン合成系の *OsIPT4* と *OsIPT5* の遺伝子が NH₄⁺ではなく、Gln または Gln 代謝産物によって発現誘導される(Sonoda et al., 2003b; Hirose et al., 1997; Kamada-Nobusada et al., 2013)。また、イネ以外でも、シロイヌナズナの *AtAMT1;1* (Rawat et al., 1999), *AtAS* (Lam et al., 1998)および *AtGS1* (Oliveira and Coruzzi, 1999) やタバコ葉の硝酸還元酵素(NR) (Vincentz et al., 1993)の各遺伝子は、Gln または Gln 代謝産物をシグナルとして発現制御される。本章の研究で示したように、GS1;2 欠損や GS 活性の阻害剤 MSX による、NH₄⁺供与後のイネ幼植物地上部基部における *OsAS1* 発現誘導の抑制(Figs. 46a, 47a)、および、Gln 供与による同地上部基部における *OsAS1* 発現誘導(Fig. 47a)は、上記の遺伝子のように、イネ地上部基部の *OsAS1* の発現が、Gln あるいは、それ以降の代謝物によって誘導されることを示唆する。加えて、以上の結果(Figs. 46, 47)は、GS1;2 によって合成された Gln が、地上部基部の *OsAS1* の発現誘導に重要であることをも示唆する。

Konishi ら(2017)は、シロイヌナズナの根において、NH₄⁺供与に応答して発現誘導される *AtGLN1;2*のプロモーター領域の欠失解析によって、NH₄⁺供与に応答した転写活性化に関与する可能性のある 41 bp の領域(-3,604 — -3,564; 翻訳開始コドン+1 とする)を推定した。この領域には、DNA-binding one zinc finger (DOF) 転写因子の推定結合モチーフ(-3,604 — -3,601: CTTT) (Yanagisawa, 2004; Le Hir and Bellini, 2013)、WRKY 転写因子の推定結合モチーフ (-3,590 — -3,586: GTCAA) (Chen and Chen, 2002; Xu et al., 2006)、basic-helix-loop-helix (bHLH)転写因子の推定結合モチーフ(-3588 — -3583: CAACTC) (Liu et al., 1998; Lei et al., 2010)、および、ウイルスコアエンハンサー転写因子の推定結合モチーフ(-3583 — -3577: CTTACCA)が存在した (Konishi et al., 2017)。この 41 bp の配列に類似した 45 bp の配列が、*OsAS1* 遺伝子の推定プロモーター領域の-451 から-495 の領域にも存在しており(Fig. 50)、DOF 転写因子の推定結合モチーフ (-454 — -451: CTTT)、WRKY 転写因子の推定結合モチーフ W-box (-495 — -491: GTCAA)、bHLH 転写因子の推定結合モチーフ E-box の一部(-475 — -470: CAACTC)、および、soybean embryo factor 4 (SEF4)エンハンサー転写因子の推定結合モチーフ (-464 — -458: ATTTTTA) (Allen et al., 1989; Jiang et al., 2013)が存在した。硝酸のシグナル伝達系とは異なり、Gln のシグナル伝達系の分子機構はほとんど分かっていない(Sakakibara et al., 2006)。今後、この 45 bp の DNA 領域が、*OsAS1* の Gln または Gln の代謝産物に応答した遺伝子発現に関わるか否かを解析することは重要であると考えられる。

また、*OsAS1* は、*OsGS1;2* と同様に、節網維管束の篩部伴細胞で高発現し(Figs. 8i, 44d)、

特に、GS1;2 欠損によって、節網維管束の篩部伴細胞での *OsAS1* の発現が減少した(Fig. 44d, e)。 *OsAS1* が、主に GS1;2 によって合成された Gln あるいは、それ以降の代謝物によって発現誘導されることを考慮すると、節網維管束の篩部伴細胞において、AS1 は、GS1;2 によって合成された Gln によって遺伝子発現が誘導され、GS1;2 と同様にリグニン合成で発生する NH_4^+ の再同化にも関与する可能性が考えられる。そして、篩部伴細胞で合成された Asn は篩管を介して腋芽へと転送され、腋芽の生長に利用されると推察される。従って、 NH_4^+ 供与下のイネ幼植物地上部基部での、GS1;2 欠損による Asn 量の減少(Fig. 22b)は、Gln 量の減少(Fig. 22a)による *OsAS1* の発現誘導の抑制に起因すると考えられる。つまり、GS1;2 は、*OsAS1* の発現制御を介して Asn 合成に関与すると考えられる。

NH_4^+ 供与下の GS1;2 欠損変異体においては、分げつ数が減少し(Fig. 5; Funayama et al., 2013)、また、本章の研究から、地上部基部の節網維管束篩部伴細胞での *OsAS1* の Gln 応答的な遺伝子発現レベルの減少(Fig. 44d, e)に起因して Asn 量が減少することが示唆された(Figs. 22b)。このことより、 NH_4^+ 供与下において、地上部基部の Asn 量が顕著に減少する AS1 欠損変異体において(Fig. 48a)、GS1;2 欠損変異体と同様に、分げつ数が減少することが予想されたが、野生型と同程度の分げつ数が観察された(Fig. 49c, e)。この際、AS1 欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、Asn 量が減少する一方で、Gln 量は同程度であったことから(Fig. 48b)、AS1 欠損変異体の分げつ数が正常な理由として、いくつかの可能性が考えられる。まず、*OsAS1* や *OsGS1;2* と同様に、*OsAS2* は節網維管束の篩部伴細胞で発現するため、同細胞において、GS1;2 が合成した Gln を基質として、AS2 が腋芽へと転送される Asn を合成し、AS1 の欠損を補っている可能性が考えられる。次に、*OsAS2* は、腋芽で発現する (Fig. 45g)ため、腋芽において、AS2 が、転送されてきた Gln より、分げつ成長に必要な Asn を合成している可能性も考えられる。また、サイトカイニン新規生合成の初発反応を担う *OsIPT4* の遺伝子は、Gln によって発現誘導されるが、Asn では発現誘導されない(Kamada-Nobusada et al., 2013)。従って、AS1 欠損変異体の地上部基部では、野生型と同程度蓄積する Gln によって(Fig. 48b)、サイトカイニン合成が野生型と同様に生じている可能性も考えられる。以上から、 NH_4^+ 供給下のイネの地上部基部では、AS1 によって合成される Asn よりも、GS1;2 によって合成される Gln の方が、分げつ生長やその調節においてより重要な窒素態であると推察される。

以上、本章の研究により、 NH_4^+ 供与後のイネ幼植物の根の Asn 合成には、AS1 が重要な役割を担うことが判明した。また、地上部基部の *OsAS1* は、Gln またはその代謝産物応答的に発現することから、GS1;2 は、*OsAS1* の発現制御を介して Asn 合成に関与することが判明した。また、地上部基部での Gln 合成は、Asn 合成よりも、分げつ伸長への重要性が高いことが示唆された。

第五章 GS1;2 欠損による分げつ数減少と地上部基部での糖代謝との関連性の解析

第一節 緒言

植物は、窒素を根から吸収して利用する一方で、炭素を空気中から CO_2 として取り込み、光合成によって糖へと同化して利用する。光合成産物であるスクロースは、植物体内の組織・器官間の転送炭素形態やエネルギー貯蔵形態として重要である。

光合成葉では、ショ糖は、細胞質ショ糖合成経路で生合成される。葉緑体包膜のトリオースリン酸トランスロケーターにより、葉緑体からサイトゾルへ輸送されたカルビン回路由来のトリオースリン酸は、アルドラーゼの触媒で、先ずフルクトース 1, 6-ビスリン酸に変換され、続いて、サイトゾル型フルクトースビスホスファターゼ(cFBP, EC 3.1.3.11)の触媒で、フルクトース 6-リン酸へと分解される。フルクトース 6-リン酸の一部は、グルコースリン酸イソメラーゼによりグルコース 6-リン酸へ、次にホスホグルコムターゼによりグルコース 1-リン酸へ、さらに、UDP-グルコースピロホスホリラーゼによって UDP-グルコースへと変換される。UDP-グルコースとフルクトース 6-リン酸から、ショ糖リン酸合成酵素(SPS, EC 2.4.1.14)の触媒でスクロース 6-リン酸が生じ、最後に、スクロース 6-リン酸が、スクロースホスファターゼ(SPP, EC 3.1.3.24)の触媒で脱リン酸化され、スクロースと無機リン酸 Pi が生ずる。この一連のスクロース合成系において、サイトゾル型 cFBP と SPS が、律速酵素として重要だと考えられている(Huber, 1986; Daie, 1993)。

第二章の研究により、 NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体の地上部基部において、糖代謝の変化が明らかになった(Figs. 15, 17, 19-22)。すなわち、GS1;2 欠損により、4 葉齢期の地上部基部において、スクロース量の減少や、フルクトース 1, 6 ビスリン酸およびデンプン量の蓄積に加えて(Fig. 22d, e, h)、*cFBP2*(Os05g0438600)と *SPP3*(Os05g0144900)の発現量が減少した(Table 1, Fig. 19)。

上記のように、cFBP と SPP は、スクロース合成関連酵素であり、イネのゲノム上には、それぞれ 2 分子種[*cFBP1* (Os01g0866400), *cFBP2* (Os05g0438600)] (Lee et al., 2008)あるいは 3 分子種[*SPP1* (Os01g0376700), *SPP2* (Os02g0143100), *SPP3* (Os05g0144900)] (Lunn et al., 2000)がコードされている。*cFBP1* と *cFBP2* の推定アミノ酸配列間には、88%の相同性があり(Lee et al., 2008)、また、各 SPP の推定アミノ酸配列の相同性は、*SPP1* と *SPP2* を比較すると 83%、*SPP2* と *SPP3* を比較すると 69%、*SPP1* と *SPP3* を比較すると 63%である(Lunn, 2003)。

cFBP1 は、葉身において高発現し、*T-DNA* 挿入 *cFBP1* 欠損変異体イネでは、スクロースやフルクトースおよびデンプンが減少し、かつ、解糖系や TCA 回路の有機酸類が蓄積したことから、葉のような光合成器官でのスクロース合成に関与することが示唆されている(Lee et al., 2008)。また、*T-DNA* あるいは *Tos17* の挿入による *cFBP1* 欠損変異体イネでは、分げつがほとんど見られなくなることから、*cFBP1* が分げつ生長に重要な役割を果た

すことも示唆されている(Lee et al., 2008; Koumoto et al., 2013)。一方、*cFBP2*は、葉身や花、根、種子において低いレベルで発現するが (Lee et al., 2008)、*cFBP2* の機能の詳細な解析はなされていない。

ここで、植物において、窒素と炭素は、アミノ酸合成をはじめとした多くの代謝過程において深く連携し、そのため、窒素代謝と炭素代謝は、お互いに緊密にクロストークしていると考えられている(Foyer et al., 2003)。イネにおいて、成長初期の分げつは、母茎や十分に生長した分げつから転流される代謝物を利用して従属栄養的に成長し(Sato, 1961)、また、茎部の窒素濃度が高いことと葉鞘部の炭水化物の茎部への移行が分げつ生長に重要であることが指摘されている(Sato, 1959; 高橋ら, 1960)。よって、窒素代謝と炭素代謝のクロストークが分げつ成長においても重要であると考えられる。しかし、その詳細な分子機構は不明なままである。

そこで、本章の研究では、GS1;2 欠損による地上部基部の糖代謝の変化に着目し、糖代謝への GS1;2 の機能的関与と糖代謝の分げつ生長への影響の検討を目的に、GS1;2 欠損による糖代謝物の利用性の低下と分げつ数減少との関連性を解析した。まず、NH₄⁺供給下の GS1;2 欠損変異体イネの地上部基部を用いて、*cFBP*や *SPP*の遺伝子発現の変動を解析し、発現変化の顕著な *cFBP2*の変異体イネを単離し、分げつ数の変化を解析した。

第二節 材料と方法

(1) 植物材料

イネの GS1;2 遺伝子の第 2 エキソンに *Tos17* が挿入された GS1;2 欠損変異体イネ系統 [NF6488(-/-): *gs1;2*] および遺伝背景の日本型イネ栽培品種日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) (野生型: WT)、ならびに、下記の(2)の方法で獲得した *Tos17* 挿入による cFBP2 変異体イネ系統 [NF9351(-/-): *cfbp2-m1*, NF2064(-/-): *cfbp2-m1*] を用いた。

(2) cFBP2 変異体イネ系統の獲得

独立行政法人農業生物資源研究所より、*Tos17* が *cFBP2* 遺伝子上に挿入されることで、*cFBP2* 遺伝子が破壊されている可能性がある候補系統イネの 2 系統(NF9351 および NF2064)の F1 種子を、それぞれ 20 粒ずつ分譲していただいた。cFBP2 変異体イネの単離のために、第四章第二節(2)と同様に栽培後、両候補系統イネ幼植物の葉からゲノム DNA を抽出し、*cFBP2* 遺伝子および *Tos17* に特異的な primer を用いた PCR およびシーケンス解析によって、*Tos17* の *cFBP2* 遺伝子上の挿入を確認した。そして、*Tos17* が *cFBP2* 遺伝子の対立遺伝子上にホモで挿入されている個体を両候補系統より PCR 法を用いて選抜し、それぞれ *cfbp2-m1* および *cfbp2-m2* と名付けた。選抜された *cfbp2-m1* および *cfbp2-m2* を土耕栽培へと移し、種子が得られるまで栽培した。

(3) 栽培方法

第二章第二節(2)と同様に、各系統の種子を塩水選後発芽させ、これらの幼植物を、発芽後から本学本農学研究科実験圃場の P1P 閉鎖系温室(26℃、5:30 から 18:30 まで補助光を点灯)にて、4 葉齢期まで水耕栽培した。

地上部基部あるいは葉身を収穫し、*cFBP* および *SPP* の各遺伝子発現の定量解析と *cFBP* の発現の組織・細胞特異性の *in situ* hybridization 法解析および糖の定量解析に供した。

また、cFBP2 変異体の分げつ数の測定には、4 葉齢まで水耕栽培した後、バーミキュライトに移植し、1 mM NH₄Cl を含む 1 強度水耕液で栽培した。発芽後、48 日間栽培し、分げつ数の測定を行った。

(4) 各 *cFBP* 分子種および *SPP* 分子種の cDNA のクローニング

cFBP1 (Os01g0866400: RAP-DB, <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/index.html>)、*cFBP2* (Os05g0438600)、*SPP1* (Os01g0376700)、*SPP2* (Os02g0143100) あるいは *SPP3* (Os05g0144900) の遺伝子配列に特異的な primer[本章本節(7)]を用いた RT-PCR により、各 *cFBP* 分子種および *SPP* 分子種の cDNA を獲得した。RT-PCR の鋳型となる一本鎖 cDNA は、total RNA を RNeasy plant kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて抽出後、得られた RNA を PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO

INC., Siga, Japan)により逆転写して獲得した。ついで、PCR 反応は、KOD Fx NEO DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて行った。得られた PCR 産物を pCR-4Blunt-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)へとクローニングし、insert cDNA の全長配列を DNA シーケンス解析(Takara 社受託解析)にて確認した。

(5) 定量的リアルタイム PCR

cFBP1、*cFBP2*、*SPP1*、*SPP2*、*SPP3*および *actin1* の各 mRNA の qPCR 解析には、それぞれの遺伝子配列に特異的な primer[本章本節(7)および第四章第二節(9)]を用いた。qPCR には Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用い、95°C 10 秒を 1 サイクル、95°C 5 秒と 60°C 34 秒を 50 サイクルの条件下で PCR 反応を行った。また、mRNA 量を定量するにあたり、*cFBP1*、*cFBP2*、*SPP1*、*SPP2*、*SPP3* または *actin1* の cDNA クローンをスタンダードとして用いて定量を行った。

(6) *in situ* hybridization 法を用いた *cFBP1* または *cFBP2* の各 mRNA の細胞分布解析

in situ hybridization 法解析は、第二章第二節(6)と同様に行った。

cFBP1 cDNA の 3'側非翻訳領域の 200 bp の DNA 断片を、特異的な primer[本章本節(7)]による RT-PCR を用いて増幅し、pBluescript II SK (-)にクローニングした。得られた鋳型プラスミドを *Hind*III で処理後、T3 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、DIG 標識 antisense 鎖 RNA probe を作成した。また、同様に、鋳型プラスミドを *Pst*I で処理し、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、コントロールの DIG 標識 sense 鎖 RNA probe を作成した。これらの操作には DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)を用いた。

さらに、*cFBP2* cDNA の 3'側非翻訳領域の 200 bp の DNA 断片を、特異的な primer[本章本節(7)]による RT-PCR を用いて増幅し、pCR-XL-TOPO (Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan)にクローニングした。pCR-XL-TOPO には、一本鎖 RNA プローブ作成のための RNA ポリメラーゼプロモーターが、DNA クローニングサイトの片側に T7 RNA ポリメラーゼプロモーターしかないため、増幅した DNA 断片が、お互いに反対方向に導入された 2 つのプラスミドを獲得し、それぞれを antisense 鎖あるいは sense 鎖の RNA probe の鋳型とした。得られた各鋳型プラスミドを *Hind*III で処理後、T7 RNA polymerase (Promega Corporation, WI, USA)を用いて、DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)により、DIG 標識された antisense 鎖あるいは sense 鎖の RNA probe を作成した。

イネ地上部基部をカミソリ(FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan)にて切り出した。切り出したサンプルは、第二章第二節(6)と同様に各処理を行い、*in situ* hybridization 法解析に供した。

(7) primer の塩基配列情報

本章の研究で用いた遺伝子特異的プライマーの塩基配列を以下に示した。

	Name	Gene	RAP-DB	RGAP	Sequence
cFBP2変異体の単離	NG7353 and NF9351-GF	cFBP2	Os01g0866400	LOC_Os01g64660	5'-TCACTTTCATTAACAGAGCCGA-3'
	NG7353 and NF9351-GR				5'-GAAATGGATTGAGATGACATGG-3'
	NF2064-GF				5'-ACCGGACGCGGCTTGCCAACGA-3'
	NF2064-GR				5'-TGCAGAAACGAACGCGAGCTTA-3'
cFPB cDNAクローンの獲得	cFBP1-CF	cFBP1	Os01g0866400	LOC_Os01g64660	5'-CTGAGGAGAGTGGTGGGAGATGGA-3'
	cFBP1-CR				5'-CAAACCGAGCTTACTTCGCTGTGC-3'
	cFBP2-CF	cFBP2	Os05g0438600	LOC_Os05g36270	5'-ATGGATCACGCGGCGGAGGCGCAGA-3'
	cFBP2-CR				5'-ACCGATGATAGACTCTGAAGCGTAC-3'
リアルタイムPCRに用いたprimer	cFBP1-RF	cFBP1	Os01g0866400	LOC_Os01g64660	5'-AGCGACGTTCTGTGGACCCCTG-3'
	cFBP1-RR				5'-GGCTGTAAACACGTCCTCAAG-3'
	cFBP2-RF	cFBP2	Os05g0438600	LOC_Os05g36270	5'-GGCCATTATCGTGCACGCTC-3'
	cFBP2-RR				5'-GGTTGCAGTACATCGTCCAA-3'
	SPP1-F	SPP1	Os01g0376700	LOC_Os01g27880	5'-CTCAGTGGTCTCTGCACGTCTT-3'
	SPP1-R				5'-GCATTTCTCCATATTACCGGA-3'
	SPP2-F	SPP2	Os05g0144900	LOC_Os05g05270	5'-TCAGCTGCACCGCGAAGAAG-3'
	SPP2-R				5'-ACGCCGATTTAACGTCTCAGG-3'
	SPP3-F	SPP3	Os02g0143100	LOC_Os02g05030	5'-CCATCTTTGCAGGCTGGTAA-3'
	SPP3-R				5'-ACGTTTCTCCAATTCTCAGA-3'
in situ hybridizationのprobeに 用いたコンストラクトの作成	cFBP1-ISF	cFBP1	Os01g0866400	LOC_Os01g64660	5'-GCTCGGTTTGATCGATCTGGCACCA-3'
	cFBP1-ISR				5'-CGGTGTATGTATTTGTAAATAATA-3'
	cFBP2-ISF	cFBP2	Os05g0438600	LOC_Os05g36270	5'-CCGGTGTTACTGAAGAGTAAAGGA-3'
	cFBP2-ISR				5'-AATTAGCTATTGCAAGGAGCTGAAA-3'

(8) 遊離の糖の定量

スクロース、グルコースおよびフルクトースの定量解析は、第二章第二節(12)と同様に、HPLC システム (Gilson, Inc., WI, USA)および COSMOSIL Sugar-D カラム (Nacal Tesque, Kyoto, Japan)を用いて行った。

(9) 分げつ数の測定

cFBP2変異体は、1 mM NH₄Cl を含む 1 強度水耕液を用いて栽培し、第二章第二節(3)と同様に分げつ数を測定した。

第三節 結果

(1) GS1;2 欠損変異体幼植物地上部基部における各 *cFBP* 分子種および *SPP* 分子種の発現解析

第二章の研究により、NH₄⁺供与下の GS1;2 欠損変異体幼植物の地上部基部におけるスクロース量の減少とフルクトース 1, 6 ビスリン酸量の増加が明らかになった (Fig. 22d, e)。また、マイクロアレイ解析結果では、GS1;2 欠損変異体幼植物の地上部基部において、スクロース合成の律速酵素である *cFBP2* および *SPP3* の遺伝子発現量が減少していた (Fig. 19)。そこで、まず、NH₄⁺供与下の GS1;2 欠損変異体と野生型の幼植物の地上部基部における *cFBP* 分子種と *SPP* 分子種の各 mRNA 発現蓄積量を定量的に再検討した (Fig. 51)。

野生型の地上部基部においては、*cFBP2* と *SPP1* の各 mRNA の発現蓄積量は、各パラログ分子種よりも 10 倍以上高かった (Fig. 51a, b)。従って、*cFBP2* と *SPP1* は、基部における主要な *cFBP* あるいは *SPP* の分子種であること示唆された。

GS1;2 欠損変異体の地上部基部では、野生型と比較して、*cFBP2* と *SPP2* の mRNA 発現蓄積量が減少した (Fig. 51a, b)。上記のように、*SPP2* mRNA の発現蓄積量は、*SPP1* mRNA と比較して微量であるため、GS1;2 欠損変異体地上部基部での *SPP2* mRNA 量の減少は、同組織のスクロース量の減少にあまり影響しないと考えられた。一方、地上部基部で支配的に発現蓄積する *cFBP2* の mRNA 発現蓄積量の減少は、GS1;2 欠損変異体地上部基部におけるスクロース量の減少に大きく影響すると考えられた。

(2) GS1;2 欠損変異体地上部基部での *cFBP1* と *cFBP2* の各 mRNA の組織・細胞レベルでの発現蓄積変化の解析

次に、地上部基部組織における各 *cFBP* mRNA の組織・細胞レベルでの発現蓄積の変化を調査した。1 mM NH₄⁺供給下で栽培した野生型と GS1;2 欠損変異体の 4 葉齢期幼植物の地上部基部組織の縦断切片に対して、*cFBP1* mRNA あるいは *cFBP2* mRNA に特異的な probe を用いた *in situ* hybridization 解析を行った。

その結果、野生型において、*cFBP1* mRNA および *cFBP2* mRNA のシグナルが、節網維管束の節部伴細胞に検出された (Figs. 52a, 53a)。さらに、野生型において、*cFBP2* mRNA のシグナルが、基部の節間の柔細胞や葉鞘の付け根の柔細胞に検出された (Fig. 53b, c)。ネガティブコントロールとして用いた sense 鎖の probe では、シグナルはバックグラウンド程度であった (Figs. 52g-i, 53g-i)。GS1;2 欠損変異体では、*cFBP1* mRNA のシグナルが、野生型と同様に、節網維管束の節部伴細胞に検出された (Fig. 52a, d) 一方で、*cFBP2* mRNA のシグナルは、いずれの細胞においても、ネガティブコントロールと同程度まで減少した (Fig. 53d-i)。

(3) *cFBP2*変異体イネの獲得と解析

続いて、イネにおける *cFBP2* の生理学的機能を明らかにするために、*cFBP2* 変異体イネの獲得を試みた。農業生物資源研究所のミュータントパネルデータベースによって公開されている、イネゲノム上の *Tos17* 挿入部位の隣接配列情報に対して、*cFBP2* 遺伝子の塩基配列を用いた BLAST 検索を行い、*cFBP2* 遺伝子上に *Tos17* が挿入された可能性のある変異体候補系統(NF9351 と NF2064)を見出した。これらの F1 種子を、農業生物資源研究所から分譲していただき、*cFBP2* 遺伝子の対立遺伝子上に *Tos17* が挿入されたホモ後代系統を選抜した。*cFBP2* 遺伝子の塩基配列上の翻訳開始点を+1 としたときに、NF9351 (*cfbp2-m1*) 系統では、*cFBP2* 遺伝子の第 5 エキソンの+1,174 から +1,175 の塩基配列位置に *Tos17* が挿入され、また、NF2064 (*cfbp2-m2*) では、第 1 エキソンの-197 から-198 の塩基配列位置に *Tos17* が挿入されていた(Fig. 54a)。

cFBP1 と *cFBP2* の各遺伝子 mRNA の定量的発現解析を、1 mM NH₄Cl を含む 1 強度水耕液を用いて栽培した *cfbp2-m1* と *cfbp2-m2* の *Tos17* 挿入 *cFBP2* 対立遺伝子ホモ系統および野生型イネの幼植物の地上部基部を用いて行った。その結果、*cfbp2-m1* と *cfbp2-m2* の地上部基部において、*cFBP2* mRNA 発現蓄積量は、野生型と比較して、それぞれ約 30% あるいは約 50% 減少した(Fig. 54b)。さらに、*cfbp2-m1* の地上部基部で検出された *cFBP2* mRNA 由来の cDNA をシーケンス解析した結果、翻訳領域内に 114 bp の欠損が確認された。この欠損により、*cFBP2* タンパク質の 38 アミノ酸残基の欠損が示唆された(Fig. 55)。一方、*cfbp2-m2* で検出された *cFBP2* mRNA 由来の cDNA の塩基配列は、野生型の *cFBP2* mRNA 由来の cDNA の塩基配列と完全に一致した。他方、両 *cfbp2* 変異体系統の地上部基部の *cFBP1* mRNA の発現蓄積量は、野生型の発現蓄積量と統計的に有意な差はなかった(Fig. 54b)。これらの結果より、*cfbp2-m1* は、*cFBP2* 欠損変異体イネであり、*cfbp2-m2* は、発現量が約半減した *cFBP2* 発現抑制変異体イネであると判断した。

次に、NH₄⁺ 供与下の *cFBP2* 変異体 2 系統の幼植物の地上部基部と葉身において、スクロースとグルコースおよびフルクトース量を測定した(Fig. 56)。その結果、野生型の地上部基部と葉身には、スクロースが同程度蓄積した(Fig. 56a, b)。しかし、*cfbp2-m1* と *cfbp2-m2* の地上部基部では、野生型と比較して、スクロース量が約 40% あるいは約 30% 減少した(Fig. 56b)。しかし、葉身のスクロース量および地上部基部のグルコース量とフルクトース量は、*cFBP2* 変異体 2 系統と野生型を比較して、統計的に有意な差はなかった(Fig. 56a, c, d)。

さらに、1 mM NH₄Cl を含む 1 強度水耕液を用いて、*cFBP2* 変異体 2 系統を長期的に栽培し、分げつ数を測定した(Fig. 57)。その結果、播種後約 50 日目の分げつ成長期初期において、*cFBP2* 変異体 2 系統で、野生型と比較して、分げつ数が約 30% 減少した(Fig. 57)。

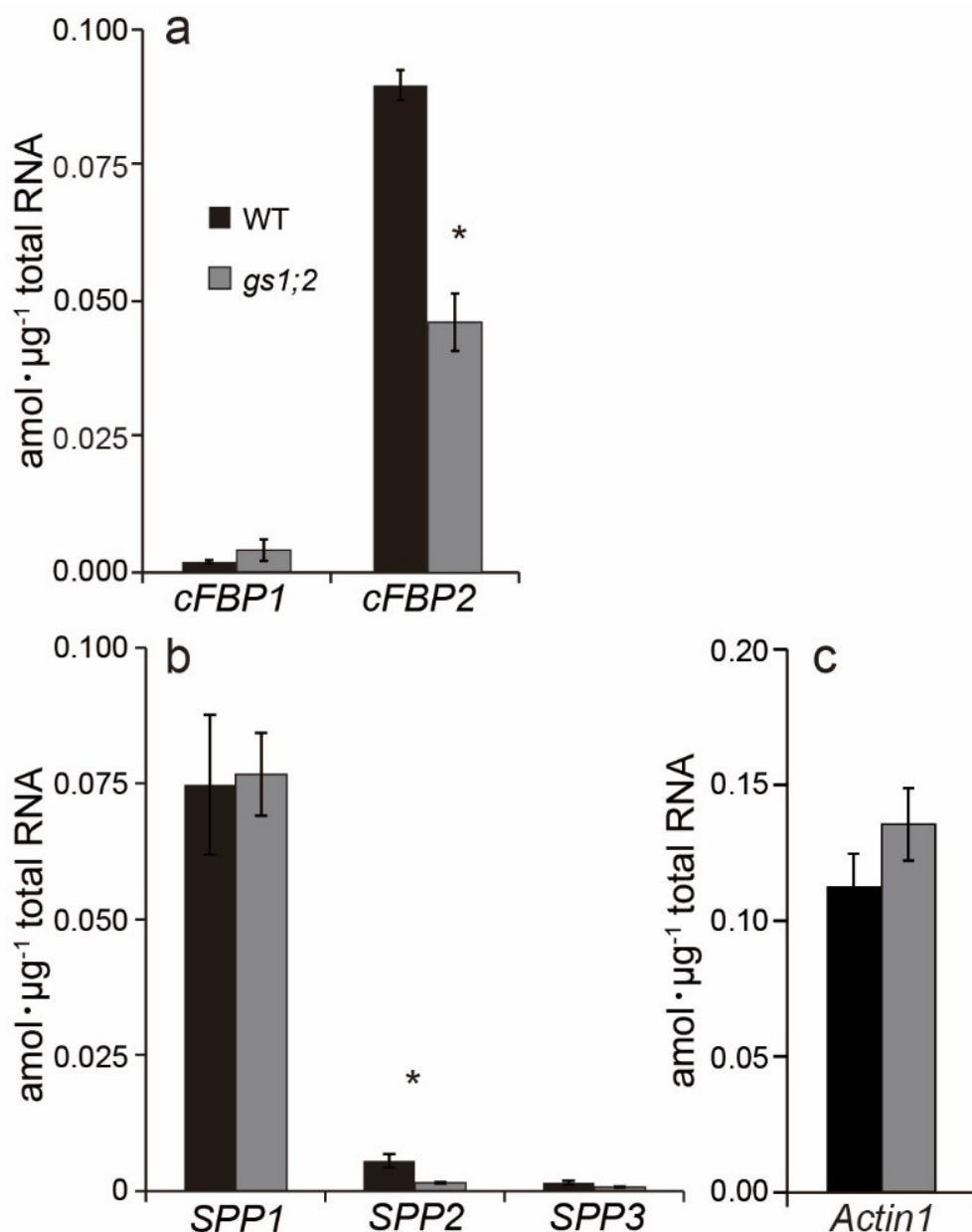


Figure 51. Quantitative real-time PCR detection of transcripts for *cFBP1*, *cFBP2*, *SPP1*, *SPP2*, *SPP3* and *actin1* in the basal parts of wild-type rice (WT) (black columns) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (gray columns) at the 4th-leaf stage. (a) *cFBP* genes (*cFBP1* and *cFBP2*). (b) *SPP* genes (*SPP1*—*SPP3*). (c) Expression of *actin1* used as a control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Asterisks denote statistically significant differences between the WT and *gs1;2* (* $P < 0.05$ according to the Student's *t*-test).

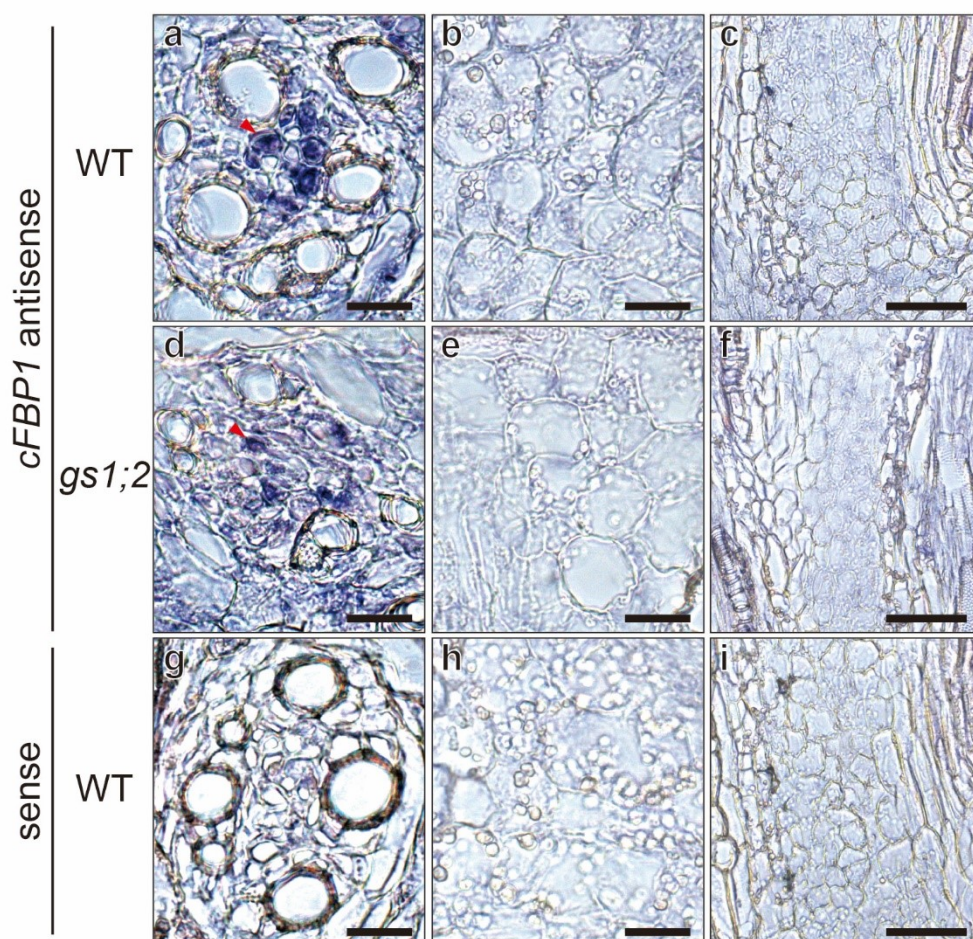


Figure 52. *In situ* localization of the *cFBP1* transcript in longitudinal sections of shoot basal parts prepared from wild-type rice (WT) (a—c, g—i) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (d—f) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to WT sections (g—i) as a negative control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . The phloem companion cells of the nodal vascular anastomoses (a, d, g) and parenchyma cells of the node (b, e, h) and the leaf sheath (c, f, i) were shown. Red arrowheads in (a, d) indicate hybridization signals of the *cFBP1* transcript in phloem companion cells of the nodal vascular anastomoses. Scale bars = 20 μm (a, b, d, e, g, h) and 50 μm (c, f, i).

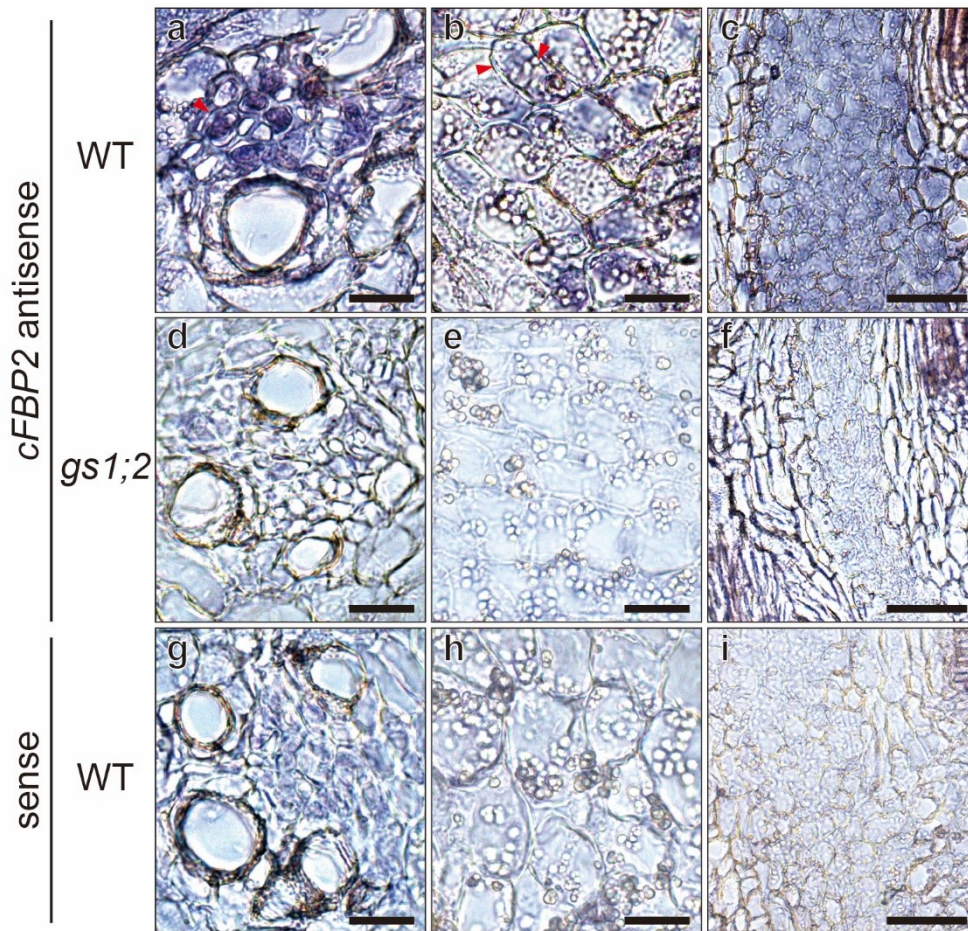


Figure 53. *In situ* localization of the *cFBP2* transcript in longitudinal sections of shoot basal parts prepared from wild-type rice (WT) (a—c, g—i) and the GS1;2 knockout mutant (*gs1;2*) (d—f) at the 4th-leaf stage. A sense probe was also hybridized to WT sections (g—i) as a negative control. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl . The phloem companion cells of the nodal vascular anastomoses (a, d, g) and parenchyma cells of the node (b, e, h) and the leaf sheath (c, f, i) were shown. The red arrowhead in (a) indicates the hybridization signal of the *cFBP2* transcript in phloem companion cells of the nodal vascular anastomoses. Note that the signal of the *cFBP2* transcript in *gs1;2* (d—f) was extremely weaker than that in WT (a—c). Scale bars = 20 μm (a, b, d, e, g, h) and 50 μm (c, f, i).

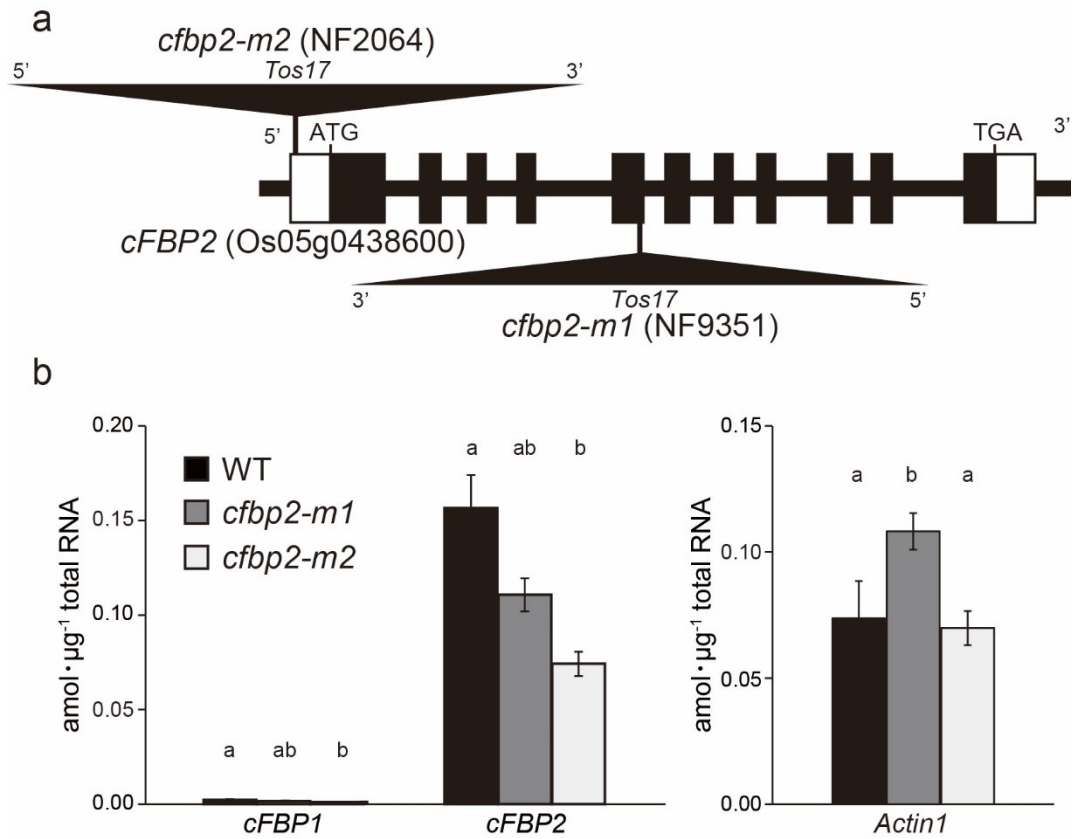


Figure 54. Isolation of *cFBP2* knockout (*cfbp2-m1*) and knockdown (*cfbp2-m2*) rice mutants. (a) Diagram of the insertion positions of the retrotransposon *Tos17* (triangles) in *cFBP2*. Exons are indicated as boxed regions, whereas lines represent introns and open boxes correspond to 5'- and 3'-untranslated sequences. (b) Quantitative real-time PCR detection of transcripts of *cFBP1*, *cFBP2*, and *actin1* in the shoot basal parts of wild-type rice (WT) (black columns) and two *cFBP2* mutants [*cfbp2-m1* (dark gray columns) and *cfbp2-m2* (light gray columns)]. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl until the 4th-leaf stage. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *cfbp2-m1* and *cfbp2-m2* seedlings ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

Wild	MDHAAEAQRTDLMITRHVLNEQGRHPESRGDFTILLSHIVLGCKFVASAVNKAGLAKLI	60
<i>cfbp-m1</i>	*****	60
Wild	GLAGDTNVQGEEQKKLDVLSNEVFVKALVSSGRTCVLVSEENEEAIIIDAPLRGKYCVCF	120
<i>cfbp-m1</i>	*****	120
Wild	DPLDGSSNIDCGVSIGTIFGIYMIKDKDNVTLDDVLQPGTDLAAGYCMYGSSCTLVLST	180
<i>cfbp-m1</i>	*****----- Deleted 38 aa -----*****	142
Wild	GNGVNGFTLDPSLGEFILTHPNIKIPNRGKIYSVNEGNAKNWDAPTAKFVEKCKFPQDGS	240
<i>cfbp-m1</i>	*****	202
Wild	PSKSLRYIGSMVADVHRTLTYGGIFLYPADQKSPNGKLRVLYEVFPMSELMQAGGQAFT	300
<i>cfbp-m1</i>	*****	262
Wild	GKQRALELVPRKIHDRSPIFLGSYDDVEDIKALYASESIIG	341
<i>cfbp-m1</i>	*****	303

Figure 55. Alignment of the deduced amino acid sequences between cFBP2 polypeptides from wild-type rice (Wild) and the *cFBP2* knockout mutant (*cfbp2-m1*). The deduced amino acid sequences are denoted as one-letter code representing each amino acid residue. Asterisk symbols in the cFBP2 in *cfbp2-m1* indicate identical amino acid residues to those of the wild-type cFBP2. Note that deletions of thirty-eight amino acid residues were observed in the cFBP2 in *cfbp2-m1*.

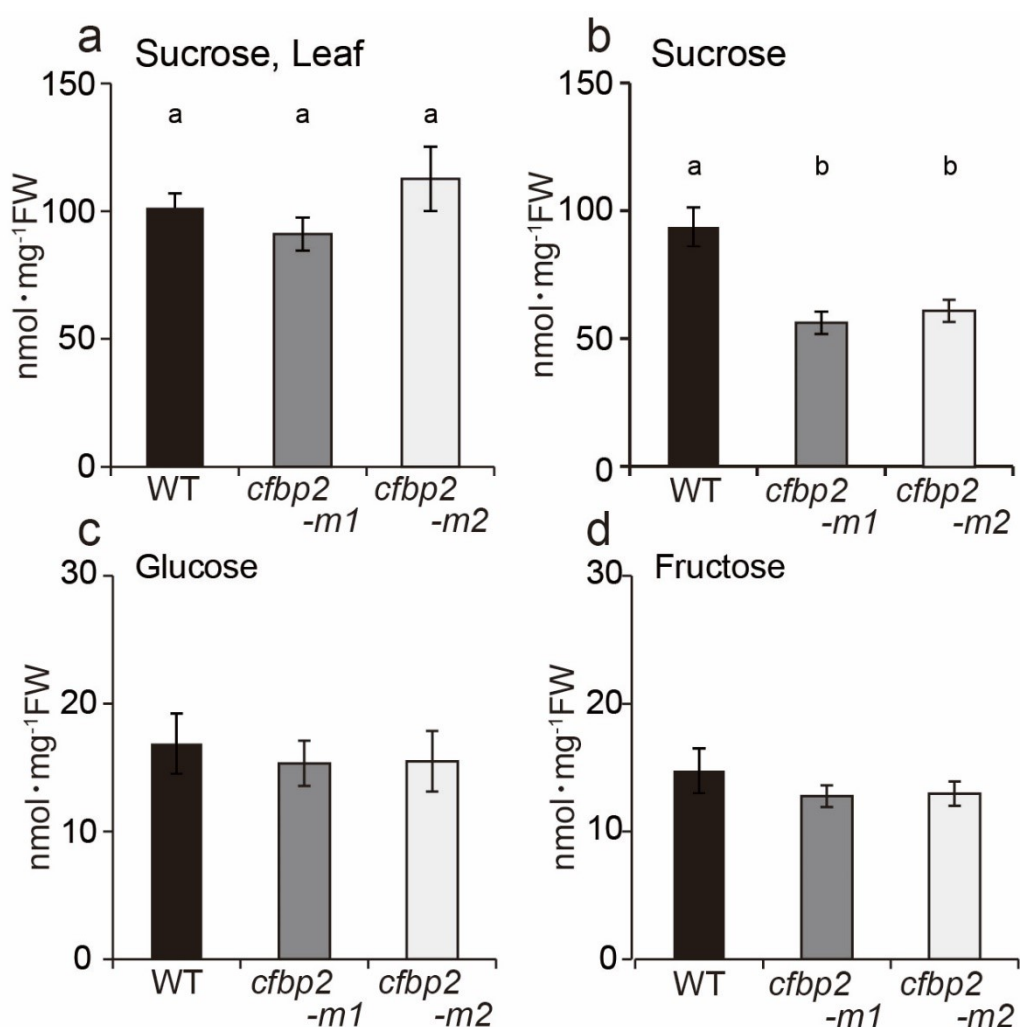


Figure 56. Changes in contents of sucrose (a, b), glucose (c) and fructose (d) in leaf blades (a) or shoot basal parts (b—d) of wild-type rice (WT) and *cFBP2* mutants (*cfbp2-m1* and *cfbp2-m2*) at the 4th-leaf stage. Seedlings were grown hydroponically in the presence of 1 mM NH₄Cl. Mean values plus the SE of five independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *cfbp2-m1* and *cfbp2-m2* seedlings (*P* < 0.05 according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

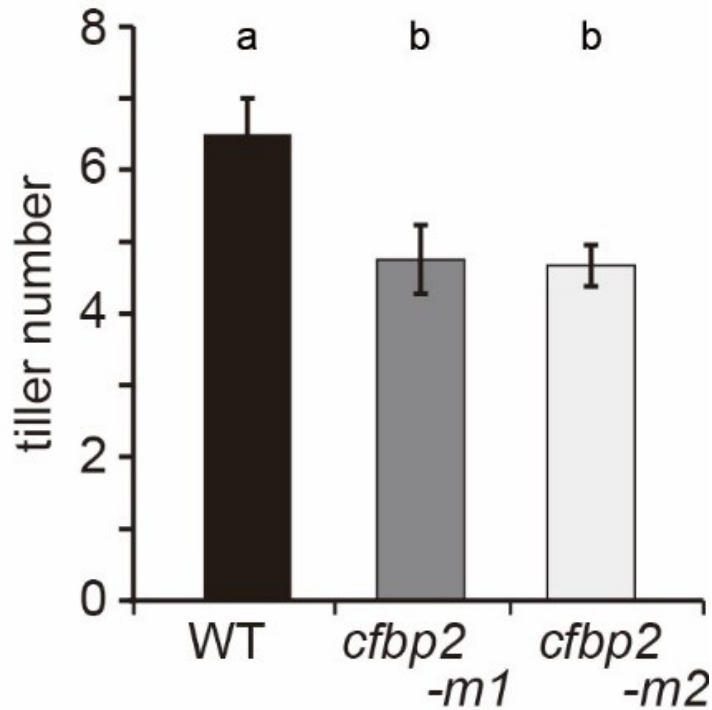


Figure 57. Comparison of the tiller number of wild-type rice (WT) and two *cFBP2* mutants (*cfbp2-m1* and *cfbp2-m2*) grown hydroponically in the presence of 1 mM NH_4Cl until 50 days after germination. Mean values plus the SE of four independent plants are indicated. Different letters at the top of each column denote statistically significant differences between the WT, *as1-m1* and *as1-m2* ($P < 0.05$ according to one-way ANOVA followed by the Bonferroni test).

第四節 考察

本章の研究では、 NH_4^+ 供与下の *GS1;2* 欠損変異体の地上部基部の糖代謝の変化に着目し、糖代謝への *GS1;2* の機能的関与と糖代謝の分げつ生長への影響の検討を目的に、*GS1;2* 欠損による糖代謝物の利用性の低下と分げつ数減少との関連性を解析した。

NH_4^+ 供与下で、スクロース量が減少する *GS1;2* 欠損変異体の地上部基部では、*cFBP2* 発現量が減少し(Fig. 51a)、また、 NH_4^+ 供与下の *cFBP2* 欠損変異体と *cFBP2* 発現抑制変異体の地上部基部では、スクロース量が減少した(Fig. 56b)。従って、*cFBP2* の発現減少が、 NH_4^+ 供与下の *GS1;2* 欠損変異体の地上部基部でのスクロース低下の一因だと示唆される。

葉身葉肉細胞のサイトゾルでのスクロース合成は、*cFBP1* が担うことが示唆されており、他方、*cFBP2* は、*cFBP1* と比較して葉身での発現量が低いことから、葉身のスクロース合成への関与が小さいと推察されている(Lee et al., 2008)。*cFBP2* 変異体 2 系統において、野生型と比較して、葉身のスクロース量は変化せず、地上部基部のスクロース量が減少した(Fig. 56a, b)。このことは、*cFBP2* が、葉身葉肉細胞サイトゾルでのスクロース合成にあまり関与しないという Lee ら(2008)の知見を支持するとともに、地上部基部でのスクロース合成において重要であることを強く示唆した。特に、*cFBP2* は、節網維管束の篩部伴細胞に加え、節間の柔細胞や葉鞘の柔細胞といったデンプンが蓄積する組織の細胞で顕著に発現した(Fig. 53a, b, c)ことから、地上部基部においてデンプン分解からのスクロース合成に関与すると考えられる。

また、Sato (1961)による、イネの分げつ生長におけるデンプン含量の消長を解析した研究では、新しく発生する分げつは、3 葉抽出頃まで、母茎や十分に生長した分げつから、炭水化物やその他の栄養の供給を受けて生長し、4 葉抽出頃から独立的に生長を始め、次第にデンプンの蓄積を増すことが示されている。従って、母茎や十分に生長した分げつにおいて、デンプンの分解によってスクロースが合成され、そして、このスクロースは、新しい分げつへと転流され、生長に利用されることが考えられる。 NH_4^+ 供与下の *cFBP2* 変異体 2 系統では、地上部基部でのスクロース量が減少し(Fig. 56b)、かつ、分げつ数が減少した(Fig. 57)ことから、*cFBP2* が、分げつ生長に利用されるスクロースの合成に関与していることが示唆される。

本章の研究により、イネにおいて、*cFBP2* が、地上部基部でのスクロース合成を介して分げつ生長に関与することが示唆され、また、 NH_4^+ 供給下のイネ幼植物における *GS1;2* 欠損による分げつ成長阻害においても、地上部基部での *cFBP2* 発現減少によるスクロース合成低下が一因であることが示唆された。ここで、地上部基部において、*cFBP2* は、*GS1;2* と同様に節網維管束篩部伴細胞で発現するが(Figs. 8i, 53a)、*GS1;2* がほとんど発現していない節間の柔細胞や葉鞘の柔細胞でも発現していた(Fig. 53b, c)ことから、*GS1;2* は、*cFBP2* 発現に直接的および間接的に関与することが予想される。植物において窒素代謝と炭素代謝は、お互いに影響しあっており、緊密にクロストークすることで、生長を決定していると

考えられている(Foyer et al., 2003)。NH₄⁺供与下のイネの地上部基部において、GS1;2 が、直接的または間接的に *cFBP2* 発現を制御する分子機構を今後解明していくことは、イネの分げつ生長における窒素代謝と炭素代謝とのクロストークの解明につながると期待される。

第六章 総合考察

植物にとって、窒素は、リンなどとともに最も不足しやすい多量必須栄養素の一つであり、窒素栄養の効率的な獲得と利用は、植物の生長と生産性を向上させる上で極めて重要である(Yamaya and Oaks, 2004)。特に、還元的土壌条件下の冠水水田で栽培されるイネは、無機態窒素源として、主に NH_4^+ を根で吸収・同化し、Gln や Asn を主体とする同化窒素を、導管を介して地上部へと転流させて利用するとともに、老化器官の窒素を Gln や Asn を主体とする転流窒素に変換後、篩管を介して、若い生長中の器官に転流させて再利用する(Yoshida, 1981; Yamaya and Oaks, 2004)。このため、イネでは、根における NH_4^+ の吸収・同化利用効率や窒素転流(リサイクル)効率が生長や生産性を決定すると考えられている(Sonoda et al., 2003a; Yamaya and Kusano, 2014)。

植物では、 NH_4^+ は、主に GS と GOGAT の共役酵素反応系(GS/GOGAT サイクル)により初期同化される(Lea and Mifflin, 1974; Yamaya and Oaks, 2004)。イネには、各 1 分子種のプラスチド型 GS2 と 3 分子種のサイトゾル型 GS1(GS1;1, GS1;2, GS1;3)が存在する(Tabuchi et al., 2007)。光呼吸系欠損変異体を用いた解析から、葉の葉緑体の GS2 が、主に光呼吸系で多量に放出される NH_4^+ の再同化で機能することが示された(Kendall et al., 1986; Wallsgrove et al., 1987)。一方、GS1 イソ酵素群が、光呼吸以外の NH_4^+ 同化において、重要な役割を有することが推測されていた(Lea and Mifflin, 2003)が、これらの各酵素群の正確な生理学的機能や、機能的重複性・独立性については不明なままであった。

当研究室では、時期・組織特異的な発現解析や *Tos17* 挿入遺伝子破壊突然変異体イネを用いた解析から、イネにおける GS1 の各分子種の個別機能を立証してきた。GS1;1 は、主に葉身維管束組織篩部の柔細胞と伴細胞に局在し、老化葉身での転流 Gln 合成で機能する(Sakurai et al., 1996; Tabuchi et al., 2005)。 NH_4^+ 供与後のイネ幼植物の根の表皮・外皮細胞群では、GS1;2 が短時間で顕著に蓄積し、イネ根での NH_4^+ の初期同化に重要であることが明らかになっている(Ishiyama et al., 1998; 2003; 2004; Funayama et al., 2013)。これら一連の研究過程で、GS1;2 欠損変異体イネにおいて、吸収 NH_4^+ の Gln への初期同化が障害を受け、さらに、分げつ数の顕著な減少とそれに伴うコメの減収が生じることが判明した(Funayama et al., 2013)。

イネは、世界三大穀物の一つであり、コメは、日本を含めた東アジアの食糧供給上の基幹穀物である。分げつ数の減少は穂数の減少に直結し、穂が実る有効分げつの数は、イネの生産性に影響を与える重要な収量構成因子の一つである。そして、窒素栄養が不十分だと有効分げつ数が減少し、充分だと分げつ数が増加することが知られている(Mae, 1997; Sakakibara et al., 2006; Liu et al., 2011)。しかし、この窒素栄養が分げつの発達を制御する詳細な分子機構は解明されていない。上述の Funayama ら(2013)の研究の結果、GS1;2 が、窒素利用に寄与し、コメの収量へ影響を与える酵素であることが示唆されたが、分げつの生長における GS1;2 の役割は不明なままであった。そこで、本博士論文研究では、窒素

の利用性に応じて調節される分げつ生長の分子機構を解明することを目指し、分げつ生長における GS1;2 の役割の解明を試みた。

分げつの生長は、「分裂組織を含む腋芽の形成」と「腋芽の伸長」の 2 段階で進行する (Hoshikawa, 1989)。第二章の研究により、GS1;2 欠損変異体では、腋芽の伸長抑制により分げつ数が減少すると判明した。したがって、GS1;2 の機能は、腋芽の伸長に関与すると考えられた。「腋芽の伸長」の制御には複数の要因が複雑に影響しあっており、その制御に関わる要因は、外的要因と内的要因に大別される (Evers et al., 2011; Kebrom et al., 2012; Domagalska and Leyser, 2011)。内的要因とは、代謝産物の利用効率と植物ホルモンのシグナル伝達ネットワークである。腋芽を含むイネの地上部基部において、GS1;2 は、節網維管束の篩部伴細胞・柔細胞と縦走大維管束および分げつ大維管束に分布した (Fig. 8a, e, i, m)。特に、篩部伴細胞への GS1;2 の局在は、GS1;2 が篩部伴細胞において転流 Gln の合成に関わり、腋芽の伸長に必要な Gln の生合成を担うことを示唆した。さらに、GS1;2 欠損変異体では、根での NH_4^+ の初期同化の低下に加え、地上部基部において窒素の利用性が低下し、腋芽への篩部を介した Gln 供給抑制や、窒素と炭素の代謝の著しい変化を引き起こし、スクロースの利用性低下 (Fig. 22d) とデンプン粒の蓄積 (Figs. 15, 22h) を招いていると考えられた。また、地上部基部の GS1;2 は、リグニン合成の際に PAL 酵素反応で放出される NH_4^+ の同化に関わることも示唆され、GS1;2 の欠損により、地上部基部のリグニン蓄積が抑制 (Fig. 13) されて、分げつ形成・生長にかかわる木化が減少すると考えられた。

以上のように、GS1;2 欠損が、地上部基部における広範な代謝の変化を引き起こし、これらの代謝の変化が腋芽の伸長の抑制の一因となっている可能性が考えられた。つまり、GS1;2 は、 NH_4^+ の同化を担うだけでなく、Gln の合成を介して、他の代謝の調節にも関与し、腋芽の伸長の制御に関わると考えられた。そこで、以降の第三章から第五章の研究では、 NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体の地上部基部における植物ホルモン (第三章)、窒素代謝 (第四章) および糖代謝 (第五章) の変化を詳細に解析し、GS1;2 の他の代謝の調節への関与と、それが腋芽の伸長に影響する分子機構の解明を試みた。

第三章の研究では、 NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体の腋芽伸長抑制は、分げつ成長の抑制ホルモンであるストリゴラクトンに非依存的であり、地上部基部の節網維管束の篩部伴細胞における GS1;2 欠損による Gln またはその代謝産物の量の減少が、同細胞におけるサイトカニン新規合成の初発反応を担い、かつ、Gln 応答性である *OsIPT4* の遺伝子発現を減少させて、サイトカニン前駆体量を著減させ、結果として腋芽分裂組織へのサイトカニン前駆体供給を不足させることにより腋芽伸長が抑制されることを示した。前述のように、植物において、同化産物の利用性とホルモンのシグナルネットワークは、腋芽が分げつに成長するか、または、休眠するかを協調的に調節していると考えられている (Hoshikawa, 1989; Domagalska and Leyser, 2011; Evers et al., 2011)。シロイヌナズナは、酸化状態の

畑に生息し、主に土壌の NO_3^- を窒素源として利用するが、シロイヌナズナにおいては、*AtIPT3* が硝酸に応答したサイトカイニン活性調節の鍵調節因子である (Takei et al., 2004)。また、*AtIPT3* と *AtIPT5* および *AtIPT7* を欠損させた三重変異体シロイヌナズナ (*ipt3,5,7*) やサイトカイニン情報伝達に関わる type-A RR の多重変異体シロイヌナズナ (*arr3,4,5,6,7,15*) を用いた最近の研究により、 NO_3^- 利用性の高い環境下では、サイトカイニンは、オーキシンを介した腋芽の分裂活性や伸長の阻害に打ち勝つように働き、腋芽を頂芽優性から回避させることが示された (Müller et al., 2015)。本研究では、イネの分げつ成長における Gln やその代謝産物に依存したサイトカイニン合成における GS1;2 の新規な役割を見いだした。シロイヌナズナにおける *AtIPT3* も、 NO_3^- 応答よりはかなり低いレベルではあるが、Gln 応答性を示す (Kamada-Nobusada et al., 2013)。このことは、Gln またはその代謝産物に依存したサイトカイニン合成とその活性制御が、植物間で保存されている重要な窒素代謝とホルモンネットワークの制御の連結点であることを推察させる。これらの知見は、植物における同化産物の利用性とホルモンのシグナルネットワークの更なる理解に大きく貢献すると考えられる。

第四章の研究では、 NH_4^+ 供給下のイネ幼植物の地上部基部の節網維管束節部伴細胞において、サイトカイニンの生合成と同様に、GS1;2 が、Gln の合成を介して、Gln またはその代謝産物に応答した *OsAS1* の発現制御に関与し、Asn 合成に寄与することを明らかにした。そして、節網維管束の節部伴細胞の AS1 によって合成された Asn は、篩管を介して、腋芽のような発達中の器官に転流されて利用され则认为られた。節網維管束節部伴細胞では、*OsAS2* も発現するが、同細胞で GS1;2 が欠損しても、その発現量は影響されなかった (Fig. 45d, e)。AS は、ATP 依存的に、Gln と Asp から Asn と Glu を生成する反応を触媒する (Lea et al., 2007; Gaufichon et al., 2010)。よって、 NH_4^+ 供給下の GS1;2 欠損変異体幼植物の地上部基部では、節網維管束節部伴細胞において、Gln 供給不足により、AS2 の Asn 合成をも阻害されていると考えられる。従って、遺伝子発現レベルのみならず、同化窒素の代謝の上でも、Gln は Asn より重要であり、分げつ伸長への寄与度はより高いと考えられる。一方、イネ根の表層細胞群において、*OsAS2* は、窒素枯渇処理下で発現蓄積し、 NH_4^+ 供与下で発現抑制された (Fig. 38)。この発現特性は、*OsGS1;1* と同様である (Tabuchi et al., 2007)。また、イネの地上部基部でも、*OsAS2* の明確な窒素応答的な発現上昇は認められなかった (Fig. 47b)。これらの結果は、イネは、根において、変動する土壌窒素環境に対して、逆の窒素応答性を示す GS1 イソ酵素遺伝子 (Tabuchi et al., 2007) と AS イソ酵素遺伝子 (Figs. 37, 38) を使い分けて、効率的に窒素を同化していることを示唆する。同様に、イネの地上部基部でも、根からの同化窒素の流通経路である節網維管束節部伴細胞において、同化窒素供給に応じて、逆の窒素応答性を示す AS イソ酵素遺伝子 (Figs. 47) を使い分けて、効率的に窒素を利用していると考えられる。ここで、GS 活性阻害剤である MSX を NH_4^+ と同時に根に加えると、地上部基部の *OsAS2* の発現が上昇した (Fig. 47b)。この現象を詳細

に解析することが、*OsAS2*の発現機構の理解に繋がるかもしれない。

第三章および第四章の研究により、 NH_4^+ 供給下のイネ幼植物の地上部基部の節網維管束篩部伴細胞において、GS1;2によって合成されたGlnあるいはGlnの代謝物をシグナルとして、*OsIPT4*や*OsAS1*が発現誘導されることが示唆された。しかし、このGln情報伝達機構の詳細は不明なままである。

現在までに比較的良く解明されている窒素情報伝達機構の一つとして、植物ホルモンであるサイトカイニンを経たシロイヌナズナやトウモロコシにおける根から葉への NO_3^- 情報伝達機構が挙げられる(Takei et al., 2002; Sakakibara, 2003; Sakakibara et al., 2006)。本機構では、 NO_3^- 供与後の根において、サイトカイニンが短時間で合成・蓄積し(Sakakibara et al., 1998; Takei et al., 2001; Hirose et al., 2008)、導管を通じて葉に転送された後、受容体型ヒスチジン(His)―タンパク質キナーゼ(HK: histidine kinase)により感知される(Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Yamada et al., 2001)。このサイトカイニンを経た窒素情報は、さらに、トランスミッター(HP: histidine-containing phosphotransmitter)/レスポンスレギュレーター(RR)二成分制御系によるヒスチジン―アスパラギン酸リン酸転移リレーにより下流へ伝達され、 NO_3^- 同化系遺伝子の発現が調節される(Takei et al., 2002; Sakakibara, 2003)。

本機構においては、 NO_3^- を感知してサイトカイニンの合成・蓄積を誘導する分子実体や分子機構は不明なままであった。ごく最近、シロイヌナズナにおいて、 NO_3^- をシグナル分子とした硝酸吸収・還元系遺伝子の初期応答性発現を制御する分子実体が明らかとされてきた(Krapp et al., 2014, Yanagisawa, 2014)。原形質膜の硝酸輸送体(Nitrate transporter: NRT)1;1/別称 chlorate-resistant (CHL)1(Tsay et al., 1993)は、硝酸トランスポーター機能のみならず硝酸濃度を感知して硝酸初期応答性遺伝子発現を制御するシグナル受容体機能をもつトランセプターである(Ho et al., 2009; Ho and Tsay, 2010)。NRT1;1/CHL1は、低濃度硝酸供給下では、サイトゾル側に露出した101番目のスレオニン(Thr-101)が、calcineurin B-like protein (CBL)-interactiong protein kinase (CIPK)23によりリン酸化されて高親和性輸送体となるとともに、情報伝達して初期応答性遺伝子の高親和性硝酸輸送体NRT2;1遺伝子の発現を誘導する(Ho et al., 2009)。さらに、高濃度硝酸(1 mM以上)供給下では、Thr-101が脱リン酸化されて、NRT1;1/CHL1は低親和性輸送体となるとともに、情報伝達してNRT2;1遺伝子発現をさらに促進する(Ho et al., 2009)。一方、転写因子のNodule inception (NIN)-like protein (NLP)は、硝酸初期応答性遺伝子発現で中心的な役割を担うマスターレギュレーターである(Yanagisawa, 2014)。NLP7は、構成的に発現し、硝酸依存的に核内に保持される(Marchive et al., 2013)。硝酸情報をN末端領域で受容したNLP7は活性型となり、その植物特異的RWP-RK DNA結合ドメインが、硝酸初期応答性遺伝子のNRT2;1、硝酸還元酵素(Nitrate Reductase: NR)遺伝子(NIA1)、亜硝酸還元酵素(Nitrite Reductase: NiR)遺伝子(NIR1)及び亜硝酸輸送体(Nitrite transporter: NITR)2遺

伝子上の nitrate-responsive *cis*-element (NRE: 5'-tGACcCTTN₁₀AAGagtcc-3')に結合して、転写促進する(Konishi and Yanagisawa, 2013; Marchive et al., 2013; Maeda et al., 2014; Yanagisawa, 2014)。極最近、細胞内への NO₃⁻流入が細胞内 Ca²⁺濃度と緊密に連携し、NO₃⁻流入を Ca²⁺濃度として情報検知した Ca²⁺dependent protein kinase (CPK)10 と CPK30 および CPK32 が核内において、NLP7 をリン酸化して活性化し、これにより、硝酸初期応答性遺伝子群が発現制御されることが示された(Liu et al., 2017)。

イネでは、*OsIPT4* や *OsAS1* に加えて、*OsAMT1;2* や *OsNADH-GOGAT1* 遺伝子が、Gln 情報伝達機構の制御下にあり、Gln または Gln 代謝産物によって、根表層の細胞群(表皮・外皮・厚膜組織)で発現誘導されることが明らかになっている(Sonoda et al., 2003b; Hirose et al., 1997)。ここで、外皮細胞間には不透水性のカスパリ線が存在するため、溶質のアポプラストを介した移行が遮断される(Enstone et al., 2003)。また、厚膜組織細胞の細胞壁は高度にリグニン化される(Morita and Abe, 1999)。これらの事実より、NH₄⁺が根で吸収されるためには、少なくとも外皮細胞に達するまでに細胞内に吸収されて、サイトゾル間の原形質連絡によるシンプラスト経路に入る必要がある (Tabuchi et al., 2007)。つまり、NH₄⁺供給下のイネの根の表層細胞群は、高濃度の NH₄⁺が蓄積する場であり、かつ、NH₄⁺初期同化が主に行われる特殊な細胞である。また、イネ幼植物地上部基部の節網維管束篩部伴細胞は、分げつへの代謝産物の転流に重要な細胞(Hoshikawa, 1989; Fig. 7)、かつ、篩管への輸送物質の積み込みを調節する細胞である(Van Bel, 1993)。イネの根表層細胞群とともに地上部基部の節網維管束篩部伴細胞は、窒素利用に重要な細胞かつ Gln 情報伝達機構が働く細胞群である。今後、これらの細胞群において、Gln 情報伝達機構を詳細に解明することは極めて重要な課題であると考ええる。

第五章の研究では、イネにおいて、*cFBP2* が、地上部基部でのスクロース合成を介して分げつ生長に関わることが示唆され、また、NH₄⁺供給下のイネ幼植物における *GS1;2* 欠損による分げつ成長阻害においても、地上部基部での *cFBP2* 発現減少によるスクロース合成低下が一因であることが示唆された。しかし、*GS1;2* と *cFBP2* 発現制御の間の分子機構は不明なままである。地上部基部では、*OsGS1;2* と *cFBP2* の発現細胞は、節網維管束篩部伴細胞で重複し(Figs. 8i, 53a)、また、*cFBP2* は、*OsGS1;2* と異なり、節間や葉鞘の柔細胞でも発現した(Fig. 53b, c)。さらに、NH₄⁺供給下の *cFBP2* 変異体イネでは、*GS1;2* が欠損していなくても、分げつ数が減少した(Fig. 57)。これらの知見から、*GS1;2* が、直接的または間接的に *cFBP2* 発現を制御している系と *GS1;2* とは独立した *cFBP2* 発現制御系が存在すると予想される。これらの分子機構の理解は、イネの分げつ生長における窒素代謝と炭素代謝とのクロストークや独立性の解明につながると考えられる。

以上、本博士論文研究では、NH₄⁺供与下の *GS1;2* 欠損変異体イネの地上部基部に焦点を当てた解析を基軸として、窒素の利用性に応じて調節される分げつ生長の複雑な分子機構

の一端を解明した。すなわち、 NH_4^+ 供与下のイネ幼植物の地上部基部では、根と同様に、GS1;2 が Gln 合成を担い、GS1;2 は、根と地上部基部で合成した Gln を介して、内的要因としての窒素・炭素代謝産物の利用性、リグニン蓄積およびサイトカイニン生合成を制御して、腋芽の伸長に係わることが判明した。このモデル図を Fig. 58 に示す。

ここで、禾本科植物における GS1 の系統発生的解析により、イネの GS1;2 やコムギ (*Triticum aestivum*) の TaGSr、トウモロコシ (*Zea mays*) の ZmGln1-1 や ZmGln1-5 を含む、根特異的な GS1 グループ (GSr) の存在が認められている (Swarbreck et al., 2011)。しかしながら、イネを除いて、多くの禾本科植物において GSr グループの GS1 酵素はあまり着目されておらず、活発に研究されていない。おそらく、多くの禾本科植物は、酸化土壌状態の畑で栽培され、主要な無機態窒素源として NO_3^- を使っており、 NO_3^- は、主に根から葉へ輸送されて、還元・同化利用されるからだろうと考えられる (Yamaya and Oaks, 2004)。しかしながら、本研究の成果は、他の禾本科植物においても、生産性について議論する上で、GSr グループの GS1 酵素が、サイトカインやリグニンの合成、窒素代謝や糖代謝といった種々の代謝に関与し、それが分げつ生長に関与するかどうか、詳しく解析する必要性を示唆する。

本博士論文研究のように、窒素栄養が分げつ発達を制御する分子機構の解明を目指して研究を行うことは、イネにおける窒素栄養の施肥と利用の調節による分げつ数の最適化、および窒素欠乏条件下における植物の生存戦略の解明につながると考えている。そして、これらの研究は、低窒素栄養肥料施肥下での持続的環境低負荷かつ高生産性の農業体系構築における極めて重要な分子基盤情報を提供すると期待される。

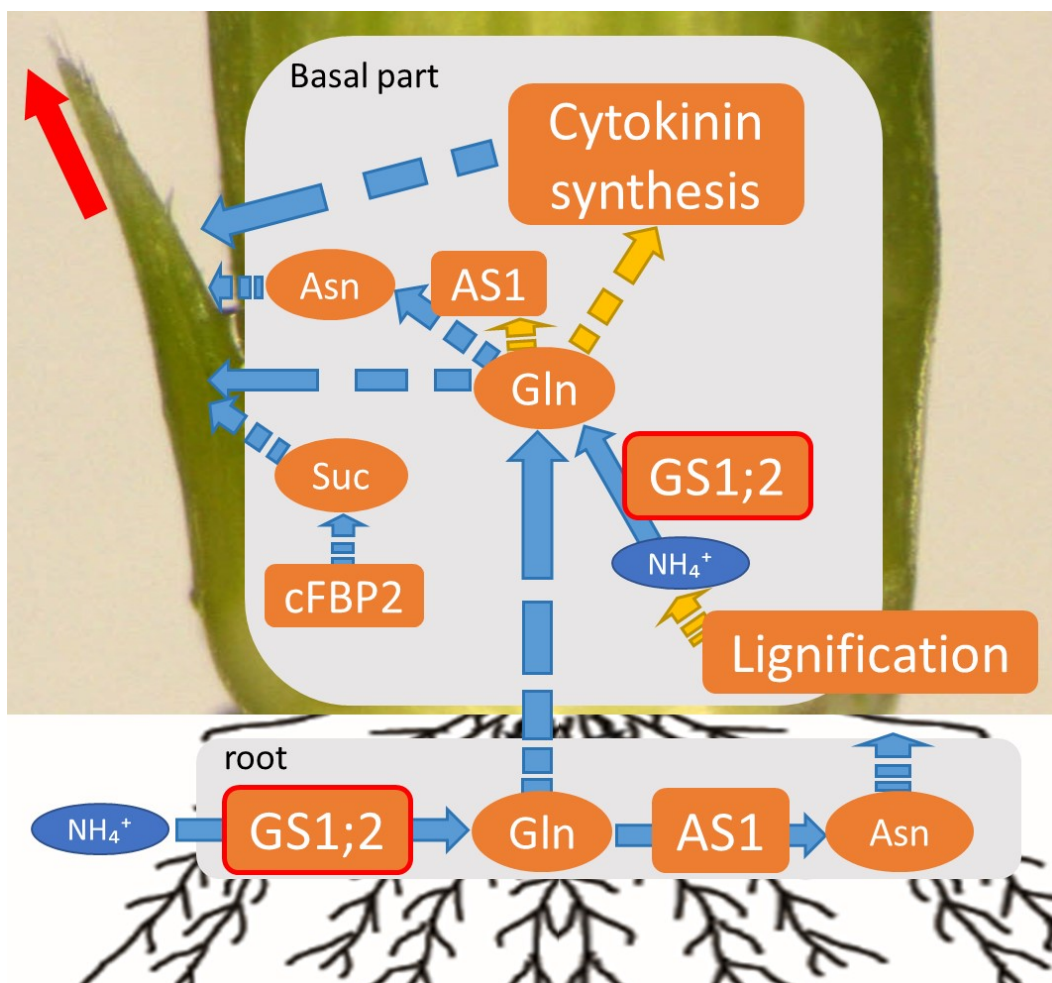


Figure 58. Schematic model of the roles of GS1;2 in NH_4^+ assimilation into Gln in roots and shoot basal parts, and Gln-mediated modulation of tillering in NH_4^+ -fed rice seedlings. GS1;2 contributes to the availability of nitrogen and carbon metabolites, lignin deposition, and cytokinin synthesis in the shoot basal parts and thereby modulating the tiller bud outgrowth.

引用文献

Albinsky, D., Kusano, M., Higuchi, M., Hayashi, N., Kobayashi, M., Fukushima, A., Mori, M., Ichikawa, T., Matsui, K., Kuroda, H., Horii, Y., Tsumoto, Y., Sakakibara, H., Hirochika, H., Matsui, M. and Saito, K. (2010) Metabolomic screening applied to rice FOX *Arabidopsis* lines leads to the identification of a gene-changing nitrogen metabolism. *Mol. Plant*, 3; 125-142.

Allen, R.D., Bernier, F., Lessard, P.A. and Beachy, R.N. (1989) Nuclear factors interact with a soybean beta-conglycinin enhancer, *Plant Cell*, 1; 623-631.

Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Kyoizuka, J. (2007) *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.*, 51; 1019-1029.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B. Methodol.*, 57; 289-300.

Boehlein, S.K., Walworth, E.S., Richards, N.G. and Schuster, S.M. (1997a) Mutagenesis and chemical rescue indicate residues involved in beta-aspartyl-AMP formation by *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *J. Biol. Chem.*, 272; 12384-12392.

Boehlein, S.K., Walworth, E.S. and Schuster, S.M. (1997b) Identification of cysteine-523 in the aspartate binding site of *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *Biochemistry*, 36; 10168-10177.

Bolstad, B.M., Collin, F., Brettschneider, J., Simpson, K., Cope, L.M., Irizarry, R. and Speed, T.P. (2005) Quality Assessment of Affymetrix GeneChip Data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* (Gentleman, R., Carey, V., Huber, W., Irizarry, R. and Dudoit, S., eds). Springer, New York, pp. 33-47.

Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. and Speed T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19; 185-193.

Braun, N., de Saint Germain, A., Pillot, J.P., Boutet-Mercey, S., Dalmais, M., Antoniadi, I., Li, X., Maia-Grondard, A., Le Signor, C., Bouteiller, N., Luo, D., Bendahmane, A., Turnbull, C. and Rameau C. (2012) The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.*, 158; 225–238.

Britto D.T., Kronzucker H.J. (2002) NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *Plant Physiol.*, 159; 567-584.

Cantón, F.R., Suárez, M.F. and Cánovas, F.M. (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Res.*, 83; 265-278.

Chen, C.H. and Chen, Z.X. (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor, *Plant Physiol.*, 129; 706-716.

Chen, C.M. and Kristopeit, S.M. (1981a) Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiol.*, 67; 494-498.

Chen, C.M. and Kristopeit, S.M. (1981b) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiol.*, 68; 1020-1023.

Chevalier, C., Bourgeois, E., Just, D. and Raymond, P. (1996) Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays L.*) root tips. *Plant J.*, 9; 1-11.

Craven-Bartle, B., Pascual, M.B., Cánovas, F.M. and Ávila, C. (2013) A Myb transcription factor regulates genes of the phenylalanine pathway in maritime pine. *Plant J.*, 74; 755-766.

Credali, A., Carcía-Calderón, M., Dam, S., Perry, J., Díaz-Quintana, A., Parniske, M., Wang, T.L., Stougaard, J., Vega, J.M. and Márquez, A.J. (2013) The K^+ -dependent asparaginase, NSE1, is crucial for plant growth and seed production in *Lotus japonicas*. *Plant Cell Physiol.*, 54; 107-118.

Daie, J. (1993) Cytosolic fructose-1,6-phosphatase: A key enzyme in the sucrose biosynthetic pathway. *Photosynthesis Research*, 38; 5-14.

Davies, K.M. and King, C.A. (1993) Isolation and characterization of a cDNA Clone for a harvest-induced Asparagine synthetase from *Asparagus officinalis* L. *Plant Physiol.*, 102; 1337-1340.

Ding, C., You, J., Chen, L., Wang, S. and Ding, Y. (2014) Nitrogen fertilizer increases spikelet number per panicle by enhancing cytokinin synthesis in rice. *Plant Cell Rep.* 33; 363-371.

Domagalska M.A. and Leyser, O. (2011) Signal integration in the control of shoot branching. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12; 211-221.

Dun, E.A., de Saint Germain, A., Rameau, C. and Beveridge, C.A. (2012) Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiol.*, 158; 487-498.

Enstone, D.E., Peterson, C.A., and Ma, F. (2003) Root endodermis and exodermis structure, function, and responses to the environment. *J. Plant Growth Regul.*, 21; 335-351.

Evers, J.B., van der Krol, A.R., Vos, J. and Struik, P.C. (2011) Understanding shoot branching by modelling form and function. *Trend Plant Sci.*, 16; 464-467.

Foyer, C.H., Parry, M. and Noctor, G. (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 54; 585–593.

Fukumorita, T. and Chino, M. (1982) Sugar, amino-acid, and inorganic contents in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.*, 23; 273-283.

Funayama, K., Kojima, S., Tabuchi-Kobayashi, M., Sawa, Y., Nakayama, Y., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2013) Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. *Plant Cell Physiol.*, 54; 934-943.

Gaufichon, L., Masclaux-Daubresse, C., Tcherkez, G., Reisdorf-Cren, M., Sakakibara, Y.,

Hase, T., Clément, G., Avice, J.C., Grandjean, O., Marmagne, A., Boutet-Mercey, S., Azzopardi, M., Soulay, F. and Suzuki, A. (2013) *Arabidopsis thaliana* *ASN2* encoding asparagine synthetase is involved in the control of nitrogen assimilation and export during vegetative growth. *Plant Cell Environ.*, 36; 328-324.

Gaufichon, L., Reisdorf-Cren, M., Rothstein, S.J., Chardon, F. and Suzuki, A. (2010) Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Sci.*, 179; 141-153.

Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P.B., Puech-Pagès, V., Dun, E.A., Pillot, J.P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C.A., Rameau, C. and Rochange, S.F. (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455; 189-194.

Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Müller, D., Herrero, R., Schmitz, G. and Theres, K. (2003) Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.*, 17; 1175-1187.

Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blount, J.W. and Dixon, R.A. (2001) Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell*, 13; 73-88.

Hanson, K.R. and Havir, E.A. (1981) Phenylalanine ammonia-lyase. In: Conn EE (ed) *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, Vol 7: Secondary Plant Products. Academic Press, San Diego, CA, pp 577-625.

Hayakawa, T., Nakamura, T., Hattori, F., Mae, T., Ojima, K., and Yamaya, T. (1994) Cellular localization of NADH-dependent glutamate-synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf blades and young grains of rice plants. *Planta*, 193; 455-460.

Hayashi, H. and Chino, M. (1990) Chemical composition of phloem sap from the upper most internode of the rice plant. *Plant Cell Physiol.*, 31; 247-251.

Herrera-Rodríguez, M.B., Carrasco-Ballesteros, S., Maldonado, J.M., Pineda, M., Aguilar, M. and Pérez-Vicente, R. (2002) Three genes showing distinct regulatory patterns encode

the asparagine synthetase of sunflower (*Helianthus annuus*). New Physiologist, 155; 33-45.

Herrera-Rodríguez, M.B., Maldonado, J.M. and Pérez-Vicente, R. (2004) Light and metabolic regulation of *HAS1*, *HAS1.1* and *HAS2*, three asparagine synthetase genes in *Helianthus annuus*. Plant Physiol. Biochem., 42; 511-518.

Herrera-Rodríguez, M.B., Maldonado, J.M. and Pérez-Vicente, R. (2006) Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence. J. Plant Physiol., 163; 1061-1070.

Hirochika H. (1997) Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. Plant Mol. Biol., 35; 231-240.

Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H. and Kanda, M. (1996) Retrotransposon of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93; 7783-7788.

Hirose, N., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (1997) Inducible accumulation of mRNA for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to ammonium ions. Plant Cell Physiol., 38; 1295-1297.

Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. and Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. J. Exp. Bot., 59; 75-83.

Ho, C.H. and Tsay, Y.F. (2010) Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. Curr. Opin. Plant Biol., 13; 604-610.

Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C. and Tsay, Y.F. (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. Cell, 138; 1184-1194.

Hodges, M. (2002) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. J. Exp. Bot., 53; 905-916.

Hoshikawa, K. (1989) The Growing Rice Plant. Nosen Gyoson Bunka Kyokai, Tokyo.

Huber, S.C. (1986) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 37; 122-146.

Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. and Kakimoto, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409; 1060-1063.

Ireland, R.J. and Lea, P.J. (1999) The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolisms. In *Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology*. Edited by Singh, B.K. pp.49-109. Marcel Dekker Inc., New York.

Ishiyama, K., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (1998) Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of nitrogen. *Planta*, 204; 288-294.

Ishiyama, K., Inoue, E., Tabuchi, M., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004) Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol.*, 45; 1640-1647.

Ishiyama, K., Kojima, S., Takahashi, H., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2003) Cell type distinct accumulations of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . *Plant Physiol. Biochem.*, 41; 643-647.

Izawa, T., Mihara, M., Suzuki, Y., Gupta, M., Itoh, H., Nagano, A.J., Motoyama, R., Sawada, Y., Yano, M., Hirai, M.Y., Makino, A. and Nagamura, Y. (2011) *Os-GIGANTEA* confers robust diurnal rhythms on the global transcriptome of rice in the field. *Plant Cell*, 23; 1741-1755.

Jain, M., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P. (2006) Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biol.*, 6; 1.

Jiang, S.Y., Ma, Z., Vanitha, J. and Ramachandran, S. (2013) Genetic variation and expression diversity between grain and sweet sorghum lines, *BMC Genomics*, 14; 18.

Kamachi, K., Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T. and Ojima, K. (1992) Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol.*, 99; 1481-1486.

Kamada, I., Yamauchi, S., Youssefian, S. and Sano, H. (1992) Transgenic tobacco plants expressing *rgp1*, a gene encoding a *ras*-related GTP-binding protein from rice, show distinct morphological characteristics. *Plant J.*, 2; 799-807.

Kamada-Nobusada, T., Makita, N., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2013) Nitrogen-dependent regulation of *de novo* cytokinin biosynthesis in rice: The role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant Cell Physiol.*, 54; 1881-1893.

Kan, C.C., Chung, T.Y., Juo, Y.A. and Hsieh, M.H. (2015) Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. *BMC Genomics*, 16; 731.

Kawachi, T., Sueyoshi, K., Nakajima, A., Yamagata, H., Sugimoto, T. and Oji, Y. (2002) Expression of asparagine synthetase in rice (*Oryza sativa*) roots in response to nitrogen. *Physiol. Plant.*, 114; 41-46.

Kebrom, T.H., Chandler, P.M., Swain, S.M., King, R.W., Richards, R.A. and Spielmeyer, W. (2012) Inhibition of tiller bud outgrowth in the tin mutant of wheat is associated with precocious internode development. *Plant Physiol.*, 160; 308-318.

Kendall, A.C., Wallsgrove, R.M., Hall, N.P., Turner, J.C. and Lea, P.J. (1986) Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta*, 168; 316-323.

Kiba, T., Kudo, T., Kojima, M. and Sakakibara, H. (2011) Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. *J. Exp. Bot.*, 62; 1399-1409.

Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. and Sakakibara, H. (2009) Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.*, 50; 1201-1214.

Komatsu, K., Maekawa, M., Ujiie, S., Satake, Y., Furutani, I., Okamoto, H., Shimamoto, K. and Kyojuka, J. (2003) *LAX* and *SPA*: Major regulators of shoot branching in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54; 11765-11770.

Konishi, M. and Yanagisawa, S. (2013) Arabidopsis NIN-like transcription factors play a central role in nitrate signalling. *Nat. Commun.*, 4: 1617.

Konishi, N., Ishiyama, K., Beier, M.P., Inoue, E., Kanno, K., Yamaya, T., Takahashi, H. and Kojima, S. (2017) Contributions of two cytosolic glutamine synthetase isozymes to ammonium assimilation in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.*, 68; 613-625.

Konishi, N., Ishiyama, K., Matsuoka, K., Maru, I., Hayakawa, T., Yamaya, T. and Kojima, S. (2014) NADH-dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in the Arabidopsis root. *Physiol. Plant.*, 152; 138-151.

Koumoto, T., Shimada, H., Kusano, H., She, K.C., Iwamoto, M. and Takano, M. (2013) Rice monoculm mutation *moc2*, which inhibits outgrowth of the second tillers, is ascribed to lack of a fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Biotechnology*, 30; 47-56

Krapp, A., David, L.C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A.S., Chaillou, S., Ferrario-Méry, S., Meyer, C., Daniel-Vedele, F. (2014) Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*, 65; 789-798.

Kronzucker, H.J. (2002) NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review, *J. Plant Physiol.*, 159; 567-584.

Krouk, G. (2016) Hormones and nitrate: a two-way connection. *Plant Mol. Biol.*, 91; 599-606.

Krouk, G., Ruffel, S., Gutiérrez, R.A., Gojon, A., Crawford, N.M., Coruzzi, G.M. and Lacombe, B. (2011) A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci.*, 16; 178-182.

Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H. and Sakakibara, H. (2012) Cytokinin activity of cis-zeatin and phenotypic alterations induced by overexpression of putative

cis-zeatin-*O*-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiol.*, 160; 319-331.

Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. and Kyoizuka, J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 45; 652-655.

Kusano, M., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Jonsson, P., Moritz, T., Ebana, K. and Saito, K. (2007) Application of a metabolomic method combining one-dimensional and two-dimensional gas chromatography-time-of-flight/mass spectrometry to metabolic phenotyping of natural variants in rice. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 855; 71-9.

Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H. and Saito, K. (2011) Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.*, 62; 1439-53.

Lam, H.M., Hsieh, M.H. and Coruzzi, G.M. (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 16; 345-353.

Lam, H.M., Peng, S.S. and Coruzzi, G.M. (1994) Metabolic regulation of the gene encoding glutamine-dependent asparagine synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 106; 1347-1357.

Larsen, T.M., Boehlein, S.K., Schuster, S.M., Richards, N.G., Thoden, J.B., Holden, H.M. and Rayment, I. (1999) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* asparagine synthetase B: a short journey from substrate to product. *Biochemistry*, 38; 16146-16157.

Le Hir, R. and Bellini, C. (2013) The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.*, 4; 164.

Lea, P.J. and Miflin B.J. (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature*, 251; 614-616.

Lea, P.J. and Miflin B.J. (2003) Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 41; 555-564.

Lea, P.J., Sodek, L., Parry, M.A.J., Shewry, P.R. and Halford, N.G. (2007) Asparagine in plants. *Ann. Appl. Biol.*, 150; 1-26.

Lee, A.K., Jeon, J.S., Börnke, F., Voll, L., Cho, J.I., Goh, C.H., Jeong, S.W., Park, Y.I., Kim, S.J., Choi, S.B., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., Cho, M.H., Bhoo, S.H., Sonnewald, U. and Hahn, T.R. (2008) Loss of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase limits photosynthetic sucrose synthesis and causes severe growth retardations in rice (*Oryza sativa*). *Plant cell and environment*, 31; 1851-1863.

Lei, H., Fukushige, T., Niu, W., Sarov, M., Reinke, V. and Krause, M. (2010) A widespread distribution of genomic CeMyoD binding sites revealed and cross validated by ChIP-Chip and ChIP-Seq techniques, *PLoS ONE*, 5; e15898.

Leyser, O. (2011) Auxin, self-organisation, and the colonial nature of plants. *Curr. Biol.*, 21; R331-R337.

Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., and Li, J. (2003) Control of tillering in rice. *Nature*, 422; 618-621.

Liu, K.H., Niu, Y., Konishi, M., Wu, Y., Du, H., Sun Chung, H., Li, L., Boudsocq, M., McCormack, M., Maekawa, S., Ishida, T., Zhang, C., Shokat, K., Yanagisawa, S. and Sheen, J. (2017) Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature*, 545; 311-316.

Liu, Y., Gu, D., Ding, Y., Wang, Q., Li, G. and Wang, S. (2011) The relationship between nitrogen, auxin and cytokinin in the growth regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tiller buds. *Aust. J. Crop Sci.*, 5; 1019-1026.

Liu, Y., Ray, S.K., Yang, X.Q., Luntz-Leybman, V. and Chiu, I.M. (1998) A splice variant of E2-2 basic helix-loop-helix protein represses the brain-specific fibroblast growth factor 1 promoter through the binding to an imperfect E-box. *J. Biol. Chem.*, 273; 19269-19276.

Lo, S.F., Yang, S.Y., Chen, K.T., Hsing, Y.I., Zeevaart, J.A.D., Chen, L.J. and Yu, S.M. (2008) A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root

development in rice. *Plant Cell*, 20; 2603-2618.

Lunn, J.E. (2003) Sucrose-phosphatase gene families in plants. *Gene*, 303; 187-196.

Lunn, J.E., Ashton, A.R., Hatch, M.D. and Heldt, H.W. (2000) Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97; 12914-12919.

Mae, T. (1997) Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant Soil*, 196; 201-210.

Mae, T. and Ohira, K. (1981) The remobilization of nitrogen related to leaf growth and senescence in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, 22; 1067-1074.

Maeda, S., Konishi, M., Yanagisawa, S. and Omata, T. (2014) Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 55; 1311-1324.

Marchive, C., Roudier, F., Castaigns, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C. and Krapp, A. (2013) Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat. Commun.*, 4; 1713.

Maruyama, K., Urano, K., Yoshiwara, K., Morishita, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., Kojima, M., Sakakibara, H., Shibata, D., Saito, K., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant Physiol.*, 164; 1759-1771.

Mérida, A., Rodríguez-Galán, J.M., Vincent, C. and Romero, J.M. (1999) Expression of the granule-bound starch synthase I (*Waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated. *Plant Physiol.*, 120; 401-409.

Miyao, A., Tanaka, K., Murata, K., Sawaki, H., Takeda, S., Abe, K., Shinozuka, Y., Onosato, K. and Hirochika, H. (2003) Target site specificity of the *Tbs17* retrotransposon shows a preference for insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 15; 1771-1780.

- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. and Kakimoto, T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.*, 37; 128-138.
- Mok, D.W. and Mok, M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52; 89-118.
- Morita, S. and Abe, J. (1999) Perspective of root research. *Jpn. J. Crop Sci.*, 68; 453-462.
- Morita, S., Lux, A., Enstone, D.E., Peterson, C.A. and Abe, J. (1996) Reexamination of rice seminal root ontogeny using fluorescence microscopy. *Jpn. J. Crop Sci.*, 65; 37-38.
- Müller, D. and Leyser, O. (2011) Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. *Ann. Bot.*, 107; 1203-1212.
- Müller, D., Schmitz, G. and Theres, K. (2006) *Blind* homologous *R2R3 Myb* genes control the pattern of lateral meristem initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18; 586-597.
- Müller, D., Waldie, T., Miyawaki, K., To, J.P.C., Melnyk, C.W., Kieber, J.J., Kakimoto, T. and Leyser, O. (2015) Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *Plant J.*, 82; 874-886.
- Nakano, K., Suzuki, T., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2000) Organ cellular localization of asparagine synthetase in rice plants. *Plant Cell Physiol.*, 41; 874-880.
- O'Brien, J.A. and Benková, E. (2013) Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.*, 4; 451.
- Ohashi, K., Makino, A. and Mae, T. (2000) Growth and carbon utilization in rice plants under conditions of physiologically low temperature and irradiance. *Aust. J. Plant Physiol.*, 27; 99-107.
- Oliveira, I.C. and Coruzzi, G.M. (1999) Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 121; 301-310.
- Olsen, K.M., Lea, U.S., Slimestad, R., Verheul, M. and Lillo, C. (2008) Differential

expression of four *Arabidopsis* *PAL* genes; *PAL1* and *PAL2* have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. J. Plant Physiol., 165; 1491-1499.

Ookawa, T. and Ishihara, K. (1993) Varietal difference of the cell wall components affecting the bending stress of the culm in relation to the loading resistance in paddy rice. Jpn. J. Crop Sci., 62; 378-384.

Ookawa, T., Todokoro, Y. and Ishihara, K. (1993) Changes in physical and chemical characteristics of culm associated with lodging resistance in paddy rice under different growth conditions and varietal difference of their changes. Jpn. J. Crop Sci., 62; 525-533.

Osugi, A. and Sakakibara, H. (2015) Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? BMC Biol., 13; 102.

Padgett, P.E., Allen, E.B., Bytnerowicz, A., and Minich, R.A. (1999). Changes in soil inorganic nitrogen as related to atmospheric nitrogenous pollutants in southern California. Atmospheric Environment. 33; 769-781.

Pearson, J. and Stewart, G.R. (1993) The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. New Phytol., 125; 283-305.

Rameau, C., Bertheloot, J., Leduc, N., Andrieu, B., Foucher, F. and Sakr, S. (2015) Multiple pathways regulate shoot branching. Front. Plant Sci., 5; 741.

Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y. and Glass, A.D. (1999) *AtAMT1* gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. Plant J., 19; 143-152.

Redestigm, H., Fukushima, A., Stenlund, H., Moritz, T., Arita, M., Saito, K. and Kusano, M. (2009) Compensation for systematic cross-contribution improves normalization of mass spectrometry based metabolomics data. Anal. Chem., 81; 7974-7980.

Ruffel, S., Krouk, G., Ristova, D., Shasha, D., Birnbaum, K.D. and Coruzzi, G.M. (2011) Nitrogen economics of root foraging: transitive closure of the nitrate–cytokinin relay and distinct systemic signaling for N supply vs. demand. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108; 18524-18529.

Sakai, H., Lee, S.S., Tanaka, T., Numa, H., Kim, J., Kawahara, Y., Wakimoto, H., Yang, C.C., Iwamoto, M., Abe, T., Yamada, Y., Muto, A., Inokuchi, H., Ikemura, T., Matsumoto, T., Sasaki, T. and Itoh, T. (2013) Rice annotation project database (RAP-DB): an integrative and interactive database for rice genomics. *Plant Cell Physiol.*, 54: e6 (doi:10.1093/pcp/pcs183).

Sakakibara, H. (2003) Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants. *J. Plant Res.*, 116; 253-257.

Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57; 431-449.

Sakakibara, H., Suzuki, M., Takei, K., Deji, A., Taniguchi, M. and Sugiyama, T. (1998) A response-regulator homolog possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize. *Plant J.*, 14; 337-344.

Sakakibara, H., Takei, K. and Hirose, N. (2006) Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends Plant Sci.*, 11; 440-448.

Sakamoto, T. and Matsuoka, M. (2008) Identifying and exploiting grain yield genes in rice. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11; 209-214.

Sakamoto, T., Sakakibara, H., Kojima, M., Yamamoto, Y., Nagasaki, H., Inukai, Y., Sato, Y. and Matsuoka, M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol.*, 142; 54-62.

Sakurai, N., Hayakawa, T., Nakamura, T. and Yamaya, T. (1996) Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. *Planta*, 200; 306-311.

Sakurai, N., Katayama, Y. and Yamaya, T. (2001) Overlapping expression of cytosolic glutamine synthetase and phenylalanine ammonia-lyase in immature leaf blades of rice. *Physiol. Plant.*, 113; 400-408.

- Sano, H., Seo, S., Orudgev, E., Youssefian, S., Ishizuka, K. and Ohashi, Y. (1994) Expression of the gene for a small GTP binding protein in transgenic tobacco elevates endogenous cytokinin levels, abnormally induces salicylic acid in response to wounding, and increases resistance to tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91; 10556-10560.
- Sato, K. (1959) Studies on starch contained in the tissues of rice plant. VI. On the elongation of upper lateral buds. *Japanese Journal of Crop Science*, 28; 30-32.
- Sato, K. (1961) Studies on starch contained in the tissues of rice plant. : VIII. Mutual relations of tillers in reference to their starch content. *Japanese Journal of Crop Science*, 30; 23-26.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G. and Theres, K. (1999) The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96; 290-295.
- Sieciechowicz, K.A., Joy, K.W. and Ireland, R.J. (1988) The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry*, 27; 663-671.
- Smyth, G.K. (2005) limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* (Gentleman, R., Carey, V.J., Dudoit, S., Irizarry, R.A. and Huber, W., eds). New York: Springer, 397-420.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., von Wirén, N., Yamaya, T. and Yamaguchi, J. (2003a) Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant Cell Physiol.*, 44; 726-734.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., Yamaya, T. and Yamaguchi, J. (2003b) Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol.*, 44; 1396-1402.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. and Mizuno, T. (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.*, 42; 107-113.

Swarbreck, S., Defoin-Platel, M., Hindle, M., Saqi, M. and Habash, D.Z. (2011) New perspectives on glutamine synthetase in grasses. *J. Exp. Bot.*, 62; 1511-1522.

Tabuchi, M., Abiko, T. and Yamaya, T. (2007) Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.*, 58; 2319-2327.

Tabuchi, M., Sugiyama, K., Ishiyama, K., Inoue, E., Sato, T., Takahashi, H. and Yamaya, T. (2005) Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1 a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant J.*, 42; 641-651.

Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M. and Sugiyama, T. (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol.*, 4; 85-93.

Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaya, T. and Sakakibara, H. (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *J. Exp. Bot.*, 53; 971-977.

Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. and Sakakibara, H. (2004) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*, 45; 1053-1062.

Tamura, W., Hidaka, Y., Tabuchi, M., Kojima, S., Hayakawa, T., Sato, T., Obara, M., Kojima, M., Sakakibara, H. and Yamaya, T. (2010) Reverse genetic approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. *Amino Acids*, 39; 1003-1012.

Tamura, W., Kojima, S., Toyokawa, A., Watanabe, H., Tabuchi-Kobayashi, M., Hayakawa, T. and Yamaya, T. (2011) Disruption of a novel NADH-glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Front. Plant Sci.*, 57; 1-9.

Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. and Mori, H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.*, 45; 1028-1036.

Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T. and Sugiyama, T. (1998) Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. FEBS Lett., 429; 259-262.

Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y. and Stitt, M. (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J., 37; 914-39.

Tobin, A.K. and Yamaya, T. (2001) Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. J. Exp. Bot., 52; 591-604.

Tsai, F.Y. and Coruzzi, G.M. (1990) Dark-induced and organ-specific expression of two asparagine synthetase genes in *Pisum sativum*. EMBO J., 9; 323-332.

Tsai, F.Y. and Coruzzi, G.M. (1991) Light represses transcription of asparagine synthetase genes in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of plants. Mol. Cell Biol., 11; 4966-4972.

Tsai, Y.C., Weir, N.R., Hill, K., Zhang, W., Kim, H.J., Shiu, S.H., Schaller, G.E. and Kieber, J.J. (2012) Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice. Plant Physiol., 158; 1666-1684.

Tsay, Y.F., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A. and Crawford, N.M. (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell, 72; 705-713.

Umehara, M., Hanada, A., Magome, H., Takeda-Kimiya, N. and Yamaguchi, S. (2010) Contribution of strigolactones to the inhibition of tiller but outgrowth under phosphate deficiency in rice. Plant Cell Physiol., 51; 1118-1126.

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, S., Arite, T., Takeda-Kimiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J. and Yamaguchi, S. (2008) Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature, 455; 195-

200.

Urquhart, A.A. and Joy, K.W. (1981) Use of Phloem exudate technique in the study of amino acid transport in pea plants. *Plant Physiol.*, 68; 750-754.

Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O.E., Palacios-Rojas, N., Selbig, J., Hannemann, J., Piques, M.C., Steinhauser, D., Scheible, W.R., Gibon, Y., Morcuende, R., Weicht, D., Meyer, S. and Stitt, M. (2005) Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiol.*, 138; 1195-204.

Van Bel, A.J.E. (1993) Strategies of phloem loading. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44; 253-281.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.*, 153(3): 895-905.

Villalobos, D.P., Díaz-Moreno, S.M., Said, E-S.S., Cañas, R.A., Osuna, D., Kerckhovern S.H.E.V., Bautista, R., Claros, M.G., Cánovas, F.M. and Cantón, F.R. (2012) Reprogramming of gene expression during compression wood formation in pine: Coordinated modulation of S-adenosylmethionine, lignin and lignin related genes. *BMC Plant Biol.*, 12, 100. (doi: 10.1186/1471-2229-12-100)

Vincentz, M., Moureaux, T., Leydecker, M.T., Vaucheret, H. and Caboche, M. (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.*, 3; 315-324.

Waldie, T., McCulloch, H. and Leyser, O. (2014) Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J.*, 79; 607-622.

Wallsgrave, R.M., Turner, J.C., Hall, N.P., Kendall, A.C. and Bright, S.W.J. (1987) Barley mutants lacking chloroplast glutamate synthetase-biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.*, 83; 155-158.

Watanabe, C.K., Sato, S., Yanagisawa, S., Uesono, Y., Terashima, I. and Noguchi, K. (2014) Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes

encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: possible relationships with respiratory rates. *Plant Cell Physiol.*, 55; 341-357.

Wong, H.K., Chan, H.K., Coruzzi, G.M. and Lam, H.M. (2004) Correlation of *ASN2* gene expression with ammonium metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 134; 332-338.

Xu, J., Zha, M., Li, Y., Ding, Y., Chen, L., Ding, C. and Wang, S. (2015) The interaction between nitrogen availability and auxin, cytokinin, and strigolactone in the control of shoot branching in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.*, 34; 1647-1662.

Xu, X.P., Chen, C.H., Fan, B.F. and Chen, Z.X. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*, 18; 1310-1326

Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.*, 42: 1017–1023.

Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59; 225-251.

Yamaya, T. and Kusano, M. (2014) Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH-glutamate synthases in rice. *J. Exp. Bot.*, 65; 5519-5525.

Yamaya, T. and Oaks, A. (2004) Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation. In *Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants*. Edited by Amâncio, S. and Stulen, I. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 35-63.

Yanagisawa, S. (2004) Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant Cell Physiol.*, 45; 386-391.

Yanagisawa, S. (2014) Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. *Plant Sci.*, 229; 167-171.

Yoneyama, K., Xie, X., Kim, H.I., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., Okota, T. and Yoneyama, K. (2012) How do nitrogen and phosphorus efficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta*, 235; 1197-1207.

Yoshida, S. (1981) *Fundamentals of rice crop science*. (International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines)

Zalabák, D., Galuszka, P., Mrízová, K., Podlešáková, K., Gu, R. and Frébortová, J. (2014) Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiol. Biochem.*, 74; 283-293.

高橋成人, 岡島秀夫, 高城成一, 本田強 (1960) 水稻分げつの発生機構. I 要素欠乏下に栽培した水稻の分げつ発生について. *東北大学農学研究所報告*, 8-2; 91-117.

中野健太郎 (2000; 平成 12 年度修士論文) イネアスパラギン合成酵素の分布と発現解析.

鈴木達郎 (1998; 平成 10 年度修士論文) イネアスパラギン合成酵素特異抗体の作製と、アスパラギン合成酵素の器官分布.

謝辞

本博士論文研究を進めるにあたり、東北大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 植物細胞生化学分野 山谷知行博士、早川俊彦博士、小島創一博士、石山敬貴博士、宮尾光恵博士に多大なる御指導・御助言を頂きました。皆様のご支援により、本研究をここまで進めることができたと考えております。心より感謝いたします。

東北大学大学院生命科学研究科 山口信次郎博士、瀬戸義哉博士、花田篤志博士をはじめとする生理活性動態分野の皆様には、ストリゴラクトンの定量に際し、ご助言とご指導をはじめ、実験装置および植物栽培施設の使用など様々な面でご協力頂きました。東京大学大学院農学生命科学研究科(現 東北大学大学院生命科学研究科) 経塚淳子博士には *in situ* hybridization 法を快くご教授して頂きました。理化学研究所環境資源科学研究センター 草野都博士(現 筑波大学生命環境科学研究科)および福島敦史博士には、ご助言をはじめ、マイクロアレイやメタボローム解析を行って頂く等、様々な面でご協力頂きました。理化学研究所環境資源科学研究センター、名古屋大学大学院生命農学研究科 榊原均博士には、ご助言をはじめ、ホルモノーム解析を行って頂きました。東京大学大学院農学生命科学研究科 附属生態調和農学機構 佐々木和宏博士には、東京大学大学院農学生命科学研究科 附属演習林 田無演習林にて、AS1 欠損変異体イネの栽培を行って頂き、イネの収量調査の方法を教授して頂きました。以上の方々との共同研究により、本研究を進められただけでなく、研究への姿勢を学ばせていただきました。謹んで感謝の意を表します。

また、本研究を行うにあたり、貴重な種子を分譲して頂きました農業生物資源研究所の廣近洋彦博士ならびに宮尾安藝雄博士に、心より感謝申し上げます。

さらに、博士課程後期3年の課程では、日本学術振興会および東北大学学際高等研究教育院から援助を頂きました。それにより、主体的に研究を行うことができました。ありがとうございました。

そして、研究指導のみならず、公私にわたり大変お世話になりました植物細胞生化学分野の皆様には、深く感謝の意を表します。

最後に、東北大学農学部入学から大学院後期課程修了までの7年半、常に暖かく私を支え、励ましてくださった家族に、心より感謝いたします。